

THESE PRESENTEE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPECIALITE : Chimie Analytique et Environnementale

Par Romain METIVIER

**Ecologie microbienne de produits végétaux : adaptation de
traitements assainissants pour la valorisation de ces produits**

Soutenue le 16 Décembre 2015 à Bordeaux

Membres du jury :

M. HADJ SASSI Abdessattar

M. GARGOURI Ali Faouzi

M. MONTET Didier

M. ATGIE Claude

M. CAUBET Roland

M. XENAKIS Aristotelis

M. BACCAUNAUD Michel

Maître de conférence, Bordeaux INP (ENSCBP)

Professeur, Université de Sfax, Tunisie

Directeur de recherche, Université de Montpellier

Professeur, Bordeaux INP (ENSCBP)

Maître de conférence, Bordeaux INP (ENSCBP)

Directeur de recherche, National

Hellenic Research Foundation, Grèce

Responsable scientifique, AGROTEC

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Invité

Ecologie microbienne de produits végétaux : adaptation de traitements assainissants pour la valorisation de ces produits

Résumé

L'utilisation de coproduits en tant que matière première provenant d'une autre voie industrielle, fait qu'il n'est plus considéré comme « déchet ». Leur valorisation est donc un axe de développement pour les entreprises agronomiques et agroalimentaires. Cependant, leur nouveau statut de « matière première » entraîne des contraintes pour les industriels. Celles-ci sont diverses selon les voies de destination : sanitaires, toxicologiques ...

Ce travail s'intéresse à deux coproduits issus de filières différentes de transformation végétale :

(1) l'épiderme de pomme, comme source d'antioxydants. Leur valorisation passe par l'emploi de matières premières peu traitées d'un point de vue phytosanitaire qui pourront être a priori plus contaminées par des flores diverses.

(2) Les broyats de végétaux issus de la culture céréalière comme matière première de produits biosourcés. Ils présentent naturellement de fortes contaminations en microorganismes sporulés.

La valorisation de ces deux coproduits nécessite donc des traitements assainissants adaptés.

Ainsi, il était indispensable de déterminer la nature, la variabilité et l'évolution des écologies microbiennes présentes sur ces coproduits par des techniques rapides de dénombrement ainsi que d'identification par biologie moléculaire. L'étude de différents procédés assainissants a également été réalisée pour combiner l'efficacité de désinfection à la préservation des qualités nutritionnelles (pomme) ou des propriétés physiques (broyats).

Mots-clés : coproduits, écologie microbienne, PCRq, PCR-DGGE, Tempo®, traitements assainissants, ozone, traitement vapeur

Microbial ecology of vegetable matter: Adaptation of cleaning treatments for the valuation of these products

Abstract

The use of byproduct as raw material from another industrial sector, facts that it is not considered any more as "waste". Their valuation is thus an axis of development for the agronomic and food-processing industry. However, their new consideration of "raw material" entails constraints for the industrialists. These constraints are diverse according to the destination ways of the byproduct: sanitary, toxicological...

This work focus on two byproducts resulting from different vegetable process:

(1) apple peels, as antioxidant source. Their valuation needs to use raw materials with low phytosanitary treatment, so these materials may be more contaminated by different floras.

(2) Crushed vegetable matter stemming from cereal crop as raw material of biosourced products. They occur naturally a strong microbial spore contamination.

The valuation of these two byproducts requires adapted cleaning treatments.

So, it was the main thing to determine nature, variability and evolution of the present microbial ecologies of these byproducts by fast techniques of enumeration and identification by molecular biology. The study of different cleaning process was also realized to combine efficiency of disinfection with the preservation of nutritional qualities (apple) or physical properties (crushed vegetable matter).

Keywords: byproducts, microbial ecology, qPCR, PCR-DGGE, Tempo®, cleaning treatments, ozone, steam treatment

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury, M. GARGOURI et M. MONTET pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse, mais également M. XENAKIS et M. ATGIE pour leur participation à ma soutenance.

Ensuite, je remercie la région Aquitaine et l'ANRT sans qui cette thèse n'aurait pas été possible. Merci également à Alain BRUGALIERES, Président d'Agrotec, à Gilles RECOUR, Directeur, et plus particulièrement à Michel BACCAUNAUD pour m'avoir accueilli durant ces 3 ans au sein de leur structure. Merci également à M. HADJ SASSI et à Roland CAUBET pour m'avoir orienté pendant cette expérience.

Un grand merci à Maria URDACI pour m'avoir accepté dans son laboratoire au gré de mes besoins et pour l'aide qu'elle m'a apporté. Je remercie également Claudine pour ces conseils, « Promis, la paillasse sera propre et rangée quand je partirai ! ». Merci à Benoît, l'ornithologue, grâce à qui je peux reconnaître plus de 3 espèces d'oiseaux ! A Anne-Marie pour son aide et qui m'a toujours interdit de travailler avec ma « blouse » couleur peau ! A Muriel pour sa bonne humeur et son sourire contagieux ainsi que pour toutes les discussions « Meubles et Décorations ». Merci aux trois jeunes du labo, Med, Mélanie et Romain pour avoir maintenu en vie les salles du LMBA après 20 h. Enfin merci à toute l'équipe de la salle café : Michelle, Pascale, Annie, Sandrine, Murielle, Alain, Alex et Alex, Steph et Jeff pour leur humour, gentillesse, accueil,... depuis 6 ans maintenant.

Je tenais aussi à remercier les équipes d'Agrotec, d'abord, l'équipe de l'Analyse sensorielle mais surtout l'équipe de l'Appui Technique. Merci à Marylin, Mme Qualité, je tiens à te dire que « je n'ai jamais oublié de mettre ma charlotte sur la halle... ». A Sylvie, notamment pour veiller au bien-être de tous en salle de pause. A Alexia et Déborah pour leur aide durant les nombreux essais sur la plateforme. A Pierre-Jean qui m'a aidé à bricoler tout un tas de trucs pour mes manips... et ma maison... A François, pour son aide au travail, pour son coaching sportif et pour m'avoir rendu sourd plus d'une fois ... A Audrey, ma voisine de bureau, qui m'a appris à râler en évitant les jurons. Et merci à Isabelle pour sa gentillesse et pour son aide précieuse.

Pour terminer, un grand merci à mes parents pour m'avoir épaulé et soutenu depuis que j'ai quitté les Deux-Sèvres. Et enfin, merci à toi Emilie, pour ton soutien, pour tes conseils, pour m'avoir suivi dans la belle ville d'Agen, je ne saurais assez t'en remercier...

Glossaire

[FAM] : 6-carboxyfluorescéine

AAEAC : capacité antioxydante en équivalent acide ascorbique

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ADN(r) : acide désoxyribonucléique (ribosomique)

AN : *Aspergillus niger*

ANOVA : analyse de variante

ARN(r) : acide ribonucléique (ribosomique)

Aw : activité de l'eau

B : pommes biologiques

BET : bromure d'éthidium

BHQ : *black hole quencher*®

BS : *Bacillus subtilis*

C : pommes conventionnelles

Ct : cycle seuil

DO : densité optique

DPD : dipropyl-p-phénylènediamine

EAA : équivalent acide ascorbique

EC : *Escherichia coli*

FAM : flore aérobie mésophile

FG : *Fusarium graminearum*

GAE : équivalent d'acide gallique

IAA : industrie agroalimentaire

IC : intervalle de confiance

MA : méthode alternative

MdR : méthode de référence

NT : pommes non traitées

pb : paire de bases

PCA : gélose pour dénombrement standard

PCR : réaction par polymérisation en chaîne

PDA : gélose dextrosée à la pomme de terre

PID : proportionnel intégral dérivé

PMS : plan de maîtrise sanitaire

POD : peroxydase

ppm : partie par million

PPO : polyphénoloxydase

R : pommes raisonnées

Rpm : rotation par minute

TC : *Total coliforms* (entérobactérie)

Tm : température de fusion

TVC : *total viable count* (flore aérobie mésophile)

UFC : Unité Formant Colonie

UV : ultraviolet

YM : levures / moisissures

Table des matières

Glossaire	4
Table des matières	2
Liste des figures	1
Liste des tableaux	1
I. Introduction.....	1
II. Etude bibliographique	3
1. Matières premières	3
1.1. La pomme : <i>Malus domestica</i> cultivar Golden <i>delicious</i>	3
1.1.1. Données économiques	3
1.1.2. Le fruit : la pomme.....	4
1.1.3. Mode de cultures	5
1.1.4. Utilisation des intrants agricoles et leurs conséquences	7
1.1.5. Récolte et conservation de la pomme.....	9
1.2. Coproduit d'origine agricole	11
2. Qualité du produit	12
2.1. Principales voies de transformation	12
2.2. Microbiologie du fruit.....	13
2.3. Flore microbienne des produits transformés	15
3. Procédés assainissants	16
3.1. Traitement thermique	16
3.2. Traitement à l'ozone	18
3.3. Lumière pulsée	29
3.4. Synthèse des traitements assainissants.....	30
4. Techniques d'évaluation et de caractérisation des populations microbiennes	33
4.1. Dénombrement par utilisation d'un milieu solide	33
4.2. Dénombrement par utilisation d'un milieu liquide : Technique du nombre le plus probable (NPP).....	35
4.3. Synthèses des techniques de dénombrement existantes	36
4.4. PCR en temps réel (PCR quantitative)	39
5. Profilage génétique	42
5.1. Ecologie microbienne	42

5.2.	Marqueurs moléculaires.....	42
5.3.	Techniques de caractérisation moléculaire : empreinte moléculaire.....	43
5.4.	Limites des méthodes moléculaires	46
III.	Matériel et méthodes.....	48
1.	Matières premières utilisées.....	48
1.1.	La pomme	48
1.1.1.	Choix de la variété et des parcelles	48
1.1.2.	Déroulement de l'étude	48
1.1.3.	Technique de prélèvement et stockage des pommes	49
1.1.4.	Caractérisation physico-chimique de pommes	51
1.2.	Coproduits végétaux d'origine agricole	53
2.	Méthode de quantification et d'identification microbienne.....	54
2.1.	Milieu de cultures microbiennes.....	54
2.2.	Méthodes de décrochage des microorganismes.....	54
2.3.	Méthode de dénombrement	55
3.	Biologie moléculaire.....	56
3.1.	Souchothèque fongique et bactérienne.....	56
3.2.	Extractions d'ADN.....	56
3.3.	Dénombrement par qPCR	57
3.4.	Identification par séquençage et par PCR-DGGE.....	57
4.	Traitement assainissant.....	59
4.1.	Traitements thermiques	59
4.2.	Traitement à l'ozone	61
4.3.	Les tests d'irradiation.....	64
5.	Analyses statistiques des résultats.....	65
IV.	Résultats / discussion	66
1.	Validation de la méthode alternative Tempo®.....	66
1.1.	Concordance entre la méthode de référence (MdR) et la méthode Tempo® avec des souches pures.....	66
1.2.	Mise au point de la méthode d'extraction des microorganismes.....	75
1.3.	Application des méthodes de dénombrement MdR et Tempo® à des flores naturelles de pommes	75
2.	Suivi des flores microbiennes au cours du stockage des fruits.....	80

2.1. Matériel biologique	80
2.2. Caractérisation de la flore fongique aux vergers	81
2.3. Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage	83
2.4. Etude des flores psychrophiles et bactériennes	87
3. Développement d'une méthode de dénombrement par PCR en temps réel	89
3.1. Méthode d'extraction.....	89
3.2. Régions cibles et choix des amorces	98
3.3. Tests des amorces « universelles ».....	101
4. Etude de l'évolution des communautés microbiennes de la pomme Golden par biologie moléculaire	116
4.1. Dénombrement différenciés et mise en collection	116
4.2. Identification par séquençage	123
4.3. Profil génétique des échantillons de pommes	125
4.4. Profil génétique fongique selon le mode cultural	128
5. Traitement à la vapeur des pommes	135
5.1. Caractérisation du dispositif de traitement à la vapeur	135
5.2. Effet du traitement vapeur sur les pommes	137
5.3. Choix du barème optimal de traitement à la vapeur	143
6. Etude de différents procédés assainissants sur des matières premières végétales entrant dans la fabrication de produits biosourcés	146
6.1. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du coproduit	146
6.2. Désinfection thermique.....	149
6.3. Traitement à l'ozone gazeux	160
6.4. Traitement par rayonnements électromagnétiques	161
7. Technique de désinfection à l'ozone.	166
7.1. Elaboration du pilote	166
7.2. Traitement de pommes ozonation	168
V. Conclusion générale	169
VI. Références bibliographiques	172
VII. Annexes	188
Annexe I	188
Annexe II	192
Annexe III	210

Annexe IV	216
Annexe V	218
Annexe VI	219

Liste des figures

Figure 1 : schéma de la coupe longitudinale (a) et transversale (b) d'une pomme (SNV Jussieux, 2012)	5
Figure 2 : mode de dissémination des pesticides dans l'environnement (d'après Singh, 2012))	8
Figure 3 : représentation schématique des différentes voies technologiques utilisables pour la transformation des fruits en préservant leur structure initiale (d'après (Bourles, 2010) adapté de (Brat and Cuq, 2007))	13
Figure 4 : représentation schématique de la patuline	15
Figure 5 : potentiel d'oxydation de composés oxydants	18
Figure 6 : stabilité de l'ozone dans du tampon phosphate à différentes valeurs de pH à 20 °C ; IC = concentration initiale calculée (d'après (Kim <i>et al.</i> , 2003)).	19
Figure 7 : réaction d'ozonolyse sur les liaisons insaturées	20
Figure 8 : influence de la pression et de la concentration du gaz vecteur sur la solubilité de l'ozone dans l'eau à 15 °C (d'après (Rodier <i>et al.</i> , 2009))	25
Figure 9 : schéma du système Venturi	26
Figure 10 : schéma d'une carte Tempo®	36
Figure 11 : représentation schématique de la méthode de détection par SYBR® Green. D'après (Botes <i>et al.</i> , 2013)	40
Figure 12 : représentation schématique de la méthode de détection par sonde Taqman®. D'après (Botes <i>et al.</i> , 2013)	41
Figure 13 : représentation schématique des gènes codant pour les ARN ribosomiques (d'après (Marques Martins, 2012)	43
Figure 14 : plan du déroulement de l'étude	48
Figure 15 : méthode de prélèvement des fruits sans contact physique	49
Figure 16 : verger en agriculture conventionnelle	50
Figure 17 : verger en agriculture biologique	50
Figure 18 : schéma du process de transformation du coproduit	53
Figure 19 : dispositif de traitement à la vapeur ; 1) Enceinte ; 2) Boîtier de contrôle ; 3) Réservoir d'eau	59
Figure 20 : enceinte de traitement avec le schéma des différentes positions des sondes de mesure de température numérotées de 1 à 4 pour celles en partie haute de l'enceinte ; de A à D pour celles au niveau de la clayette et M pour la sonde centrale	60
Figure 21 : four utilisé pour la désinfection des poudres	61
Figure 22 : pilote de génération d'ozone de la société Alphatech	62
Figure 23 : courbe d'étalonnage pour le dosage des oxydants (ozone et chlore total).	63
Figure 24 : appareil utilisé pour l'irradiation de la rafle par un rayonnement UV	64
Figure 25 : dispositif de lumière pulsée	65
Figure 26 : comparaison des dénombrements des suspensions d' <i>E. coli</i> entre la MdR (PCA) et la méthode Tempo®, carte TVC. n=4 (sauf Série n°2 n=3)	67
Figure 27 : comparaison de la méthode Tempo® et de la MdR (PCA) pour <i>E. coli</i> avec les cartes TVC avec : a) diagramme de dispersion ; b) diagramme de différences	68

Figure 28 : dénombrement de la solution mère d' <i>E. coli</i> avec la MdR (PCA) et la méthode Tempo [®] , carte TC. n=4 (sauf Série n°2 et 5 n=3)	69
Figure 29 : comparaison de la méthode Tempo [®] et de la MdR (PCA) dans le cas de dénombrements d' <i>E. coli</i> avec les cartes TC avec ; a) diagramme de dispersion ; b) diagramme de différence	70
Figure 30 : étude de l'effet matrice des pommes Bio et Conventionnelles lors de dénombrements de suspensions d' <i>E. coli</i> (FAM ; carte Tempo [®] TVC et gélose PCA) diluées dans du broyat de Pommes Bio (a) et Pommes Conventionnelles (b)	71
Figure 31 : dénombrement des suspensions de <i>S. cerevisiae</i> avec la MdR (Sabouraud au Chloramphénicol) et la méthode Tempo [®] , carte YM. n=4 ; Méthode Tempo [®] n = 3.	72
Figure 32 : comparaison de la méthode Tempo [®] et de la MdR dans le cas de dénombrements de <i>S. cerevisiae</i> avec les cartes YM : a) diagramme de dispersion ; b) diagramme de différences	73
Figure 33 : étude de l'effet matrice des pommes Bio et Conventionnelles sur le dénombrement de suspensions de <i>S. cerevisiae</i> (Levures / Moisissures ; carte Tempo [®] YM et gélose Sabouraud au chloramphénicol) diluées dans du broyat de Pommes Bio (a) et Pommes Conventionnelles (b).....	74
Figure 34 : cinétique de décrochage des microorganismes présents sur l'épiderme de pomme par homogénéisation et sonication	75
Figure 35 : résultats de dénombrement de la FAM pour les pommes Conventionnelles, Bio, Non Traitées et Raisonées à J-7 et J-0 par la méthode Tempo [®] TVC et la MdR. (Non Traitées et Raisonées : n=9 ; Bio et Conventionnelles : n=25).....	76
Figure 36 : histogramme de différences représentant en pourcentage le rapport des résultats de dénombrement de la FAM entre la méthode Tempo [®] et la MdR	76
Figure 37 : Résultats obtenus avec la boîte de dénombrement sur 3 dilutions successives de 10 en 10 (de gauche à droite) à J-0 pour la FAM sur milieu PCA ; Pommes Bio (B), Conventionnelles (C), Non Traitées (NT) et Raisonées (R)	77
Figure 38 : résultats de dénombrement des levures / moisissures pour les pommes Conventionnelles, Bio, Non Traitées et Raisonées à J-7 et J-0 par la méthode Tempo [®] et la MdR. (Non Traitées et Raisonées : n=9 ; Bio et Conventionnelles : n=25).....	78
Figure 39 : histogramme de différences représentant en pourcentage le rapport des résultats de dénombrement des Levures/moisissures entre la méthode Tempo [®] YM et la MdR (Sabouraud au chloramphénicol)	78
Figure 40 : Résultats obtenus avec la boîte de dénombrement sur 3 dilutions successives de 10 en 10 (de gauche à droite) à J-0 pour les levures et moisissures sur milieu Sabouraud au chloramphénicol ; Pommes Bio, Conventionnelles, Non Traitées et Raisonées	79
Figure 41 : résultat des boîtes de dénombrement des pommes Conventionnelles, Raisonées et Non Traitées sur Sabouraud au chloramphénicol 5 jours après incubation à 25°C. (Boîtes aux dilutions 10 ⁻²).....	81
Figure 42 : répartition en pourcentage des levures/moisissures à J-7 et J0 lors d'un dénombrement sur milieu Sabouraud au chloramphénicol : a) Pommes Conventionnelles ; b) Pommes Bio ; c) Pommes Raisonées ; d) Pommes Non Traitées	82
Figure 43 : évolution de la FAM pendant et après la récolte lors de dénombrement sur milieu gélosé PCA pour les pommes Bio et Conventionnelles. n=25 (p=0,05)	83
Figure 44 : évolution de la FAM avant, pendant et après la récolte lors de dénombrement par la méthode Tempo [®] TVC pour les pommes Bio et Conventionnelles. n=25 (p=0,05)	84

Figure 45 : évolution de la flore fongique avant, pendant et après la récolte lors de dénombrement sur milieu gélosé Sabouraud au chloramphénicol pour les pommes Bio et Conventionnelles. n=25 (p=0,05).....	84
Figure 46 : évolution de la flore fongique pendant et après la récolte lors de dénombrement par la méthode Tempo® YM pour les pommes Conventionnelles et Bio, n=25, pour les Raisonnées et Non Traitées, n=9. (p=0,05)	85
Figure 47 : évolution de la flore fongique levures et moisissures pendant et après la récolte observée par dénombrement sur gélose de Sabouraud au chloramphénicol. n=25 (p=0,05)	86
Figure 48 : dénombrement de la FAM et de la flore psychrophile (10 jours ; 10 °C) (a) et pour les levures et moisissures (b) pour les pommes Conventionnelles et Bio	87
Figure 49 : boîte de dénombrement en condition mésophile (30 °C) (a) et en condition psychrophile (10 °C) (b) d'échantillon de pommes conventionnelles sur gélose Sabouraud au chloramphénicol.	88
Figure 50 : schéma du protocole original du kit NucleoSpin Soil.....	91
Figure 51 : résultat d'extraction d'ADN de mycélium de <i>F. graminearum</i> ; gel d'agarose 1% avec dépôt de 5 µl d'extrait d'ADN par les 6 conditions ci-dessus.	93
Figure 52 : résultat d'extraction d'ADN de spores d' <i>A. niger</i> ; gel d'agarose 1% + BET avec dépôt de 5 µl d'extrait d'ADN.....	95
Figure 53 : résultat d'extractions d'ADN de 5 espèces différentes. Gel agarose 1% + BET ; 5 µL de marqueur (M) Phage Lambda ECORI/HindIII ; T1 et T2 : témoins (-) d'extraction (EC = <i>E. coli</i> ; BS = <i>B. subtilis</i> ; SC = <i>S. cerevisiae</i> ; FG = <i>F. graminearum</i> ; AN = <i>A. niger</i> ; T = Témoin négatif d'extraction ; SE = tampon d'élution des ADN).....	97
Figure 54 : schéma de l'ADN ribosomique 18 S chez la levure <i>S. cerevisiae</i> . (V = domaine variable) .	100
Figure 55 : courbes d'amplification d'une gamme de dilution d'ADN de <i>S. cerevisiae</i> sans (en vert) ou avec ADN de pomme Golden à 10 µg / µL (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pépins de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification réalisée avec les amorces NL1-LS2.....	101
Figure 56 : courbes de fusion d'une gamme de dilution d'ADN de <i>S. cerevisiae</i> sans (en vert) ou avec ADN de pomme Golden à 10 µg / µL (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification réalisée avec les amorces NL1-LS2	103
Figure 57 : courbes d'amplification d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes présentant des charges microbiennes différentes. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventionnelles à J0 et Conventionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification par NL1-LS2.....	104
Figure 58 : courbes de fusion d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes avec différentes charges fongiques. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventionnelles à J0 et Conventionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pépins de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification par NL1-LS2	105
Figure 59 : courbes d'amplification d'une gamme de dilution d'ADN de <i>S. cerevisiae</i> sans (en vert) ou avec ADN de pépins de pomme Golden à 10 µg / µL (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 µg /	

μL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification réalisée avec les amorces U1-U2	106
Figure 60 : courbes de fusion d'une gamme de dilution d'ADN de <i>S. cerevisiae</i> sans (en vert) ou avec ADN de pomme Golden à 10 μg / μL (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 μg / μL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification réalisée avec les amorces U1-U2.....	107
Figure 61 : courbes d'amplification d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes de différentes charges microbiennes. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventiionnelles à J0 et Conventiionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 μg / μL d'ADN de pépins de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification par U1-U2.....	108
Figure 62 : courbes de fusion d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes de différentes charges microbiennes. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventiionnelles à J0 et Conventiionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 μg / μL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification par U1-U2	109
Figure 63 : courbes d'amplification d'extraits d'ADN de souche pure <i>S. cerevisiae</i> et <i>A. niger</i> , d'épiderme de pommes de différentes charges microbiennes. Amplification par les sondes FungiQuant.....	110
Figure 64 : courbe d'amplification d' <i>A. niger</i> (en vert) et <i>S. cerevisiae</i> (en bleu) avec différentes concentrations en amorces sens (0,7 et 0,9 μM) et antisens (0,2 et 0,5 μM). En rouge, courbe obtenue avec 10 μg / μL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification avec les amorces nu-SSU	112
Figure 65 : courbe de fusion d' <i>A. niger</i> (en vert) et <i>S. cerevisiae</i> (en bleu) avec différentes concentrations en amorces sens (0,7 et 0,9 μM) et antisens (0,2 et 0,5 μM). En rouge, courbe obtenue avec 10 μg / μL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> . En jaune, mix PCR seul. Amplification avec les amorces nu-SSU	113
Figure 66 : évolution des Ct pour chaque microorganisme en fonction des températures d'hybridations (n=2) (AN = <i>A. niger</i> ; FG = <i>F. graminearum</i> ; SC = <i>S. cerevisiae</i>).....	114
Figure 67 : gel DGGE 8 % d'acrylamide pour la mise au point d'un marqueur spécifique pour le profil génétique de la pomme. M Bactérie : marqueur interne au laboratoire pour les profils bactériens (sert uniquement à contrôler la migration) ; T (-) : témoin négatif de PCR ; AN : <i>Aspergillus niger</i> ; FG : <i>Fusarium graminearum</i> ; Xx-x-J8 : code des champignons isolés de la pomme (cf. tableau x). Gradient dénaturant 30 – 50 %, 5 h de migration à 130 V.	126
Figure 68 : identification des bandes du marqueur Champignon pour la PCR-DGGE	127
Figure 69 : gel DGGE 8 % d'acrylamide des profils génétiques des pommes issues de mode de culture différents : Conventiionnel, Bio, Raisonné et Non Traité. Marqueur Champignon : marqueur interne champignon ; T (-) : témoin négatif de PCR. Gradient dénaturant 30 – 50 %, 5 h de migration à 130 V.	128
Figure 70 : profil électrophorétique de la souche <i>Metschnikowia sp.</i> isolée (piste 2) des échantillons de pommes Non Traitées (piste 3). Piste 1 : marqueur champignon.	132
Figure 71 : arbre phylogénétique d'espèces du genre <i>Metschnikowia</i> et d'espèces de référence (<i>Debaryomyces hansenii</i> et <i>S. cerevisiae</i>) ; <i>Bootstrap</i> 100, méthode du <i>neighbor-joining</i> (d'après (Mendonça-Hagler et al., 1993).	133

Figure 72 : schéma de l'ARN ribosomique à partir de la fin 3' de l'ARN 18 S (a) et localisation des amorces 5,8 et 28 S pour l'identification des champignons (b) (d'après (Khot <i>et al.</i> , 2009))	134
Figure 73 : profil des courbe de délai mise en régime du traitement à vapeur (1 : Montée en température ; 2 : Stabilisation ; 3 : Régulation à la température de consigne ; 4 : Chute de température).....	135
Figure 74 : photos de pommes Conventionnelles traitées à la vapeur : a) Echantillon de pommes conventionnelles non traitées ; b) Pommes traitées à la vapeur : 1) 55 °C : 30 sec à 2 min ; 2) 65 °C : 30 sec à 1,5 min ; 3) 75 °C : 30 sec et 1 min.....	140
Figure 75 : comparaison de l'intensité du brunissement des différents barèmes de traitement.....	142
Figure 76 : suivi de la quantité de polyphénols totaux et du pouvoir antioxydant pour deux traitements.....	143
Figure 77 : schéma du phénomène de convection au sein de poudre de granulométries différentes. Le transfert thermique dans la petite granulométrie est plus lent que dans la grosse granulométrie.	146
Figure 78 : homogénéisation des micro-organismes en fonction du temps de malaxage au BagMixer. (a) dénombrement de la FAM sur PCA ; (b) Dénombrement des levures / moisissures sur Sabouraud au chloramphénicol ; vitesse de malaxage à 8 (rapide) n=1.	147
Figure 79 : dénombrements des Poudres 1 et 3 non contaminées. n=3	148
Figure 80 : dénombrements différenciés (levures et moisissures) des Poudres 1 et 3. n=3.....	148
Figure 81 : courbes de suivi de montée en température à cœur des Poudres 1 (vert) et 3 (violet). Les flèches rouges correspondent aux sorties de poudres.	149
Figure 82 : dénombrement de la FAM au cours d'un traitement par chaleur sèche pour la Poudre 1 à différents paliers de températures.	150
Figure 83 : dénombrement de la FAM au cours d'un traitement par chaleur sèche pour la Poudre 3 à différentes températures.	150
Figure 84 : suivi des températures dans le four (en bleu) et à l'intérieur de la poudre (en rouge) lors du traitement par chaleur sèche de la Poudre 2 (montée en température progressive)	151
Figure 85 : dénombrement de la FAM au cours d'un traitement par chaleur sèche pour la Poudre 2 à différentes de températures. Les temps de traitements dépendent du temps pour atteindre la température indiquée (cf. Figure 82).	151
Figure 86 : effet du traitement à la chaleur sèche ou humide sur la survie de <i>B. subtilis</i> de la Poudre 3.	152
Figure 87 : suivi des températures lors d'un traitement par chaleur sèche ou humide à 150 °C dans l'ambiance du four et à cœur des Poudres 1 et 2 : a) chaleur sèche, b) chaleur humide.	153
Figure 88 : suivi des températures dans l'ambiance du four et au cœur du produit BR1 et BR2 lors d'un traitement de 30 min en chaleur humide	154
Figure 89 : suivi des températures dans l'ambiance du four et au cœur du produit BR1 et BR2 lors d'un traitement de 30 min en chaleur humide avec séchage final de 10 min à 150°C (la température du four reste bloquée à 100 °C pendant 4 min à cause d'une déconnection accidentelle de la sonde de mesure)	154
Figure 90 : dénombrement de la FAM après traitements par chaleur humide contrôler pour les produits BR1 et BR2	156

Figure 91 : dénombrement des levures et moisissures après traitements par chaleur humide pour les produits BR1 et BR2	156
Figure 92 : résultats de dénombrement des échantillons de BR1 et BR2 traités 40 min à 150 °C avec 2 phases (30 min humidité 100 % puis séché 10 min avec humidité 14 % ; 150°C)	157
Figure 93 : résultats de dénombrement avant traitement (NT) et après traitement des fractions BR2 différenciées en Flocon et Granulat ; 40 min à 150 °C avec 2 phases (30 min humidité 100 % puis séché 10 min avec humidité 14 % ; 150°C) (n=3).....	158
Figure 94 : courbe de suivi des températures et de pression lors du traitement par autoclave à eau de la Poudre 3.	159
Figure 95 : dénombrements de la FAM (assimilée <i>B. subtilis</i>) pour différents temps de traitement à l’ozone à 45 g/h pour les poudres 1, 2 et 3 contaminées.....	160
Figure 96 : dénombrements des levures et des moisissures pour différents temps de traitement à l’ozone à 45 g/h pour les poudres 1, 2 et 3 contaminées.....	161
Figure 97: dénombrements de la FAM pour différents temps de traitement aux UV pour les Poudres 1, 2 et 3 contaminées	162
Figure 98 : dénombrements des levures et des moisissures pour différents temps de traitement aux UV pour les Poudres 1, 2 et 3 contaminées.....	162
Figure 99 : a) pourcentage de rayonnement transmis à travers le film ; b) absorbance du film	163
Figure 100 : résultat de dénombrements de la flore mésophile aérobie après traitement à la lumière pulsée ; a) 3 types de Poudre 1, 2 et 3 avec 1 ou 3 doses ; b) Poudre 2 avec 3 épaisseurs différentes	164
Figure 101 : photos en microscopie électronique à balayage de la Poudre 2 à l’agrandissement a) X 200 ; b) X 500 ; c) X 2000	165
Figure 102 : schéma du pilote de génération d’ozone	167
Figure 103 : vue d’ensemble des points de prélèvement de pommes	200
Figure 104 : vue d’ensemble des points de prélèvement de pommes	201
Figure 105 : vue aérienne du site : emplacement approximatif (à quelques mètres près)	202
Figure 106 : parcelle A (raisonnée) Lot 1 : 4 arbres (les lots 2 et 3 ont des fruits plus petits ou malade et moins nombreux)	203
Figure 107 : parcelle E non traitée	204
Figure 108 : vue Aérienne du verger conventionnel	205
Figure 109 : photos du verger en agriculture conventionnelle.....	206
Figure 110 : vue aérienne du verger biologique	207
Figure 111 : photos du verger en agriculture biologique	208
Figure 112 : suivi de température (en rouge) et d’hygrométrie (en bleu) du dans le caisson de stockage des pommes Bio	209
Figure 113 : suivi de température (en rouge) et d’hygrométrie (en bleu) du dans le caisson de stockage des pommes Conventionnelles	209
Figure 114 : notice de la carte Tempo® TVC.....	210
Figure 115 : notice de la carte Tempo® YM.....	213
Figure 116 : exemple de résultat de comparaison de résultat de séquençage avec les bases de données.....	216

Figure 117 : séquence du locus LOC103420821 de <i>Malus domestica</i> à laquelle s'hybride les amorces NL1-LS2	217
Figure 118 : système colorimétrique CIELab	218
Figure 119 : boîtes de dénombrement de Poudre 1, dilution 1/100 a) FAM (PCA) ; b) levures / moisissures (Sabouraud au chloramphénicol).....	219
Figure 120 : à gauche, Poudre 3 non traitée, à droite, Poudre 3 traitée par autoclave.....	219
Figure 121 : à gauche, Poudre 2 non traitée, à droite, Poudre 2 traitée par autoclave.....	219

Liste des tableaux

Tableau I : production française des variétés de pommes les plus cultivées (PROGNOSFRUIT, 2014)...	4
Tableau II : pesticides chimiques et leurs cibles principales (d'après (Baldi <i>et al.</i> , 2013)	8
Tableau III : temps de demi-vie de l'ozone gazeux ou dissous dans l'eau (pH 7) en fonction de la température (d'après (Okafor, 2011)).....	19
Tableau IV : comparaison des deux méthodes de production d'ozone (d'après (O'Donnell <i>et al.</i> , 2012)	24
Tableau V : effet de l'ozone sur le stockage des pommes et des poires.	28
Tableau VI : technologies assainissantes retrouvées en IAA	31
Tableau VII : techniques de dénombrement disponibles pour des analyses agroalimentaires	37
Tableau VIII : tableau récapitulatif des avantages et inconvénients spécifiques aux techniques d'empreintes moléculaires. D'après (Marques Martins, 2012) adapté de (Hurst <i>et al.</i> , 2007; Kirk <i>et al.</i> , 2004).	47
Tableau IX : milieux et conditions de culture des différentes flores et microorganismes	54
Tableau X : cartes Tempo® et conditions de culture des différentes flores et microorganismes	55
Tableau XI : amorces utilisées pour l'amplification et l'identification des champignons	57
Tableau XII : amorces utilisées pour l'amplification et la détection de la région conserve de l'ARNr 26 S des champignons, région D1-D2.....	59
Tableau XIII : préparation de la solution de iodate de potassium iodurée pour la courbe d'étalonnage avec la méthode DPD (d'après(Rodier <i>et al.</i> , 2009))	63
Tableau XIV : comparaison des concentrations moyennes et leur valeur P obtenues pour <i>E. coli</i> la FAM.....	67
Tableau XV : Comparaison des concentrations moyennes et leur valeur P obtenues pour <i>E. coli</i> avec la carte TC	69
Tableau XVI : valeurs caractérisant les droites de régression pour l'étude de l'effet matrice des pommes biologiques et conventionnelles avec la carte TVC.....	72
Tableau XVII : comparaison des concentrations moyennes et de leur valeur P obtenues pour <i>S. cerevisiae</i> avec la carte YM	73
Tableau XVIII : valeurs caractérisant les droites de régression pour l'étude l'effet matrice des pommes Bio et Conventionnelles avec la carte YM	74
Tableau XIX : concentrations (en UFC / g ; MdR PCA) de la FAM présente sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage	83
Tableau XX : concentrations (en NPP / g ; Tempo® TVC) de la FAM présente sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage	84
Tableau XXI : concentrations (en UFC / g ; MdR Sabouraud au chloramphénicol) des levures et des moisissures présentes sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage	85
Tableau XXII : concentrations (en NPP / g ; Tempo® YM) des levures et moisissures présentes sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage	85
Tableau XXIII : résultats d'extraction d'ADN sur mycélium de <i>F. graminearum</i> par dosage optique au NanoDrop.....	93

Tableau XXIV : résultats d'extraction d'ADN sur spore d' <i>A. niger</i> par dosage optique au NanoDrop. .	94
Tableau XXV : résultats d'extraction d'ADN sur spore d' <i>A. niger</i> par dosage optique au NanoDrop et dénombrement sur boîte.	95
Tableau XXVI : résultats d'extractions d'ADN de 5 espèces de micro-organismes différents.....	97
Tableau XXVII : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 55	102
Tableau XXVIII : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 57	104
Tableau XXIX : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 59	107
Tableau XXX : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 61	109
Tableau XXXI : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 63	111
Tableau XXXII : valeur des Ct pour le choix des concentrations en amorces nu-SSU.....	113
Tableau XXXIII : valeurs des Ct en fonction du microorganisme et de la température d'hybridation.	114
Tableau XXXIV : description des différents phénotypes des colonies retrouvés sur les boîtes de dénombrement des levures / moisissures à J0 ; a) Pommes Non Traitées ; b) Pommes Raisonées ; c) Conventiionnelles ; d) Bio.	117
Tableau XXXV : description des différents phénotypes retrouvés sur les boîtes de dénombrement des levures / moisissures à J + 8 Mois : a) Pommes Bio ; b) Pommes Conventiionnelles.	121
Tableau XXXVI : identification et proportion des phénotypes majoritaires de champignon retrouvés dans les échantillons de pommes à J-0 (jour de la récolte) ainsi qu'après 8 mois de stockage en froid positif (J + 8 mois).	123
Tableau XXXVII : comparaison des températures moyennes (<i>résultats brutes non montrés</i>) selon consignes en différents points de mesure (A, B, C, D, M, 1, 2, 3) dans l'enceinte	136
Tableau XXXVIII : effet du traitement à la vapeur sur la flore artificielle de levures <i>Metschnikowia</i> .	138
Tableau XXXIX : comparaison des valeurs du paramètre L* avant et après traitement à la vapeur à différentes températures et temps	140
Tableau XL : comparaison de l'intensité du brunissement des différents barèmes de traitement	141
Tableau XLI : quantification des polyphénols totaux et du pouvoir antioxydant de pommes pour deux traitements.....	142
Tableau XLII : barèmes optimaux de traitement des pommes	144
Tableau XLIII : valeur colorimétrique L, a et b et variation de la teinte et de la saturation	155
Tableau XLIV : résultats des dénombrements des flores mésophiles aérobies et des flores fongiques avant et après traitement par autoclave, pallier à 121 °C pendant 15 min.	159
Tableau XLV : table des intervalles de confiance pour le dénombrement des petits nombres	188
Tableau XLVI : table de Macgrady à 3 entrées avec 3 tubes par série	189
Tableau XLVII : echantillon de la table de Macgrady à 3 entrées pour 16 puits utilisée par le système TEMPO®	190
Tableau XLVIII : liste des traitements phytosanitaires du verger biologique.....	192
Tableau XLIX : liste des traitements phytosanitaires du verger conventionnel	195
Tableau L : délais de mise en régime du dispositif de traitement à la vapeur à différentes températures de consigne	218

I. Introduction

Le travail de cette thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation de coproduits de transformation industrielle de matières végétales.

Un coproduit est un sous-produit dont la réutilisation, en tant que matière première dans une autre voie industrielle, fait qu'il n'est plus considéré comme un déchet. Sa valorisation est donc un axe de développement pour les entreprises. Cependant, leur nouveau statut de matière première (et non plus de déchet) entraîne des contraintes pour les industriels. Ces contraintes sont diverses selon les voies de destination : d'ordre sanitaire, toxicologique ...

Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à deux coproduits issus de deux filières différentes de transformation végétale : (a) la peau de pommes, comme source d'antioxydants (vitamines, polyphénols ...) et (b) les broyats de végétaux pour la fabrication de produits biosourcés.

Ces deux coproduits, de par leur origine végétale, sont largement contaminés par des flores microbiennes diverses issues de l'environnement. Leur valorisation nécessite donc des traitements assainissants adaptés.

a) Actuellement, dans la filière pomme, les fruits sont souvent stockés pendant plusieurs mois au froid avant d'être transformés par les industriels. La majorité des fruits sont donc traités, dès leur culture en verger, avec des produits phytosanitaires pour éviter le développement de flores d'altération, tout au long de leur cycle de vie, phase de conservation comprise. Dans ce contexte, les industriels de la transformation considèrent les épidermes de pommes comme déchets et non comme coproduits, car ces peaux sont non valorisables du fait qu'elles peuvent contenir des résidus de produits phytosanitaires.

La valorisation des peaux passe donc par l'utilisation de matières premières peu traitées d'un point de vue phytosanitaire. Cela nécessite de lever des contraintes que n'ont pas les unités de transformations classiques. En effet, ces matières premières végétales pourront être à *priori* (1) plus contaminées ou (2) différemment contaminées d'un point de vue qualitatif, qu'un produit classiquement traité au verger. Notre travail a consisté, pour différents modes de culture de pommes, à : (1) déterminer la nature et la variabilité de la flore microbienne initiale aux vergers (2) suivre les populations microbiologiques tout au long du stockage (3) étudier différents procédés assainissants pour combiner efficacité sur la réduction des flores et préservation des qualités nutritionnelles des produits de transformation.

b) Les matières végétales comme matières premières de produits biosourcés. Le produit étudié est issu de la culture céréalière. Laissé usuellement aux champs après récolte de la partie noble du végétal, ce déchet est récupéré par des industriels pour être transformé en poudre de granulométries différentes. Les poudres deviennent donc des coproduits utilisés comme matières premières dans divers secteurs industriels comme la cosmétique, l'industrie mécanique, la pharmacie, l'alimentation animale ... Ces coproduits présentent naturellement de fortes contaminations en microorganismes sporulés. Notre travail a été d'étudier l'efficacité de différents procédés assainissants, adaptés à ces produits, qui se caractérisent par de faibles teneurs en eau.

Ces travaux de thèse ont donc été réalisés dans le cadre d'un partenariat de compétences entre le Centre de Ressources Technologiques (CRT) AGROTEC et deux équipes du CBMN (UMR CNRS 5248) : l'équipe du Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée (LMBA) et l'équipe Colloïdes et Lipides pour l'Industrie et la Nutrition (CLIP'IN).

Pour ces études, les moyens utilisés sont : méthode rapide de dénombrement Tempo®, PCR quantitative en temps réel, PCR-DGGE, outils classiques de microbiologie et de biologie moléculaire pour identification, différents pilotes de traitements assainissant (ozone, vapeur, chaleur sèche et humide), *challenge tests process*.

II. Etude bibliographique

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux écologies microbiennes de deux produits d'origine agricole : un fruit, la pomme et un coproduit issus de l'agro-industrie céréalière. Ces deux produits présentent des compositions de flores microbiennes différentes avec chacune leur spécificité. De ce fait, l'adaptation de traitements assainissants est nécessaire, d'une part, pour maîtriser ces flores et d'autre part, pour préserver les qualités de chacun. La pomme est un fruit possédant une écologie microbienne complexe qui peut varier durant les mois de stockage. Le coproduit est la matière première d'un circuit de valorisation dont les charges microbiennes peuvent être aléatoires selon les conditions de stockage. Pour ces deux produits, la maîtrise sanitaire est donc primordiale. Pour cela, nous développerons dans cette étude bibliographique, les moyens technologiques assainissants existant ainsi que les méthodes permettant le contrôle de leur efficacité.

1. Matières premières

1.1. La pomme : *Malus domestica* cultivar Golden delicious

1.1.1. Données économiques

La pomme est de nos jours l'un des fruits le plus cultivé dans le monde avec une production mondiale de 80,8 millions de tonnes en 2013 (FAOSTAT, 2013) et plus de 6000 variétés. La Chine, plus gros producteur mondial, draine à elle seule quasiment 50 % du marché avec ses 39,7 millions de tonnes annuelles. L'Europe n'est pas en reste avec sa production en 2013 de 16 millions de tonnes. En 2014, la France a produit 1,5 millions de tonnes faisant d'elle le 3^{ème} producteur européen (derrière la Pologne et l'Italie). C'est d'ailleurs le fruit le plus consommé en France avec ses 20,3 % de part de marché en volume devant la banane et l'orange (respectivement 14,6 et 12,4 %), soit près de 18,5 kg / an / ménage acheteur (ANPP, 2015). La pomme Golden est la plus cultivée (Tableau I).

Tableau I : production française des variétés de pommes les plus cultivées (PROGNOSFRUIT, 2014)

Variétés	Récoltes 2014 (en millions de tonnes)	% des variétés
Golden	456	30,7
Gala	277	18,6
Granny	144	9,7
Pink Lady®	122	8,2
Braeburn	77	5,2
Rouges	51	3,4
Belchard ®	50	3,4
Fuji	50	3,4
Autres	260	17,5
Total	1487	100

Les régions les plus productrices sont les régions Provence-Alpes-Côte-d’Azur (24 %), le Midi-Pyrénées (17 %) et les pays de la Loire (15 %). La région Aquitaine produit quant à elle 10 % de la production française (AGRESTE, 2014) avec ses 2118 hectares de vergers de pommiers (Chambre d’agriculture 47, 2015).

1.1.2. Le fruit : la pomme

La pomme domestique, *Malus domestica*, est le fruit du pommier, généralement considéré comme une baie contenant des pépins. Elle fait partie de la famille des *Rosaceae*, tribu *Pyreae* (Velasco *et al.*, 2010). Sa partie charnue est constituée du conceptacle de la fleur appelé ovaire infère. Les graines sont entourées d’un endocarpe cartilagineux. Ce type de fruit composite est un faux fruit, le fruit étant en réalité l’ensemble du carpelle, de l’endocarpe et des graines (Figure 1). Il porte le nom de piridion comme les coings et les poires (SNV Jussieux, 2012).

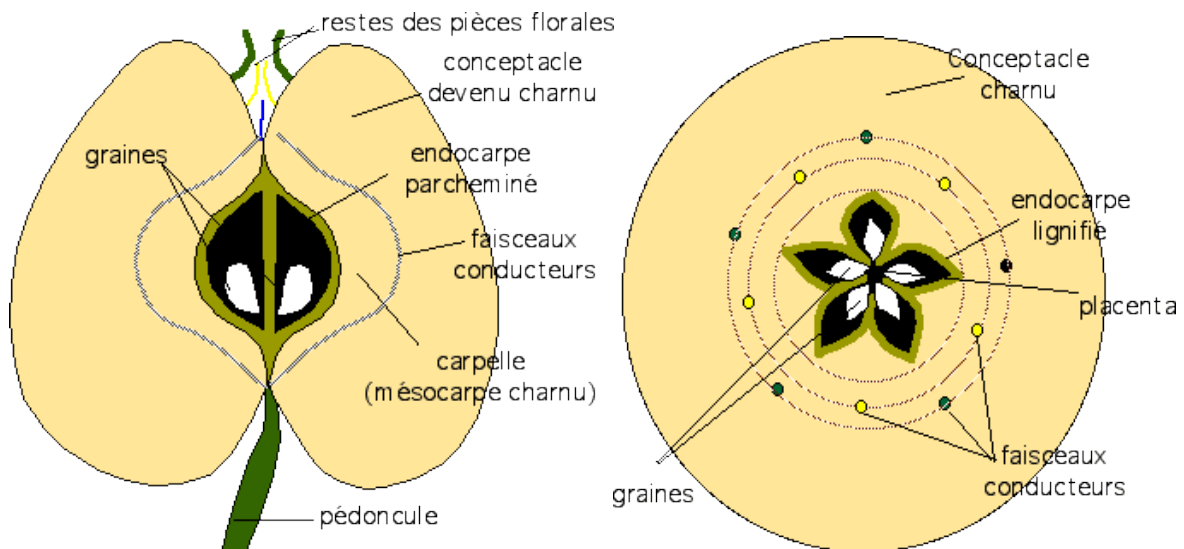


Figure 1 : schéma de la coupe longitudinale (a) et transversale (b) d'une pomme (SNV Jussieux, 2012)

Le développement de la pomme comprends 3 phases (Esnault, 2004) :

- la phase de croissance composée de la pré-anthèse, avec la multiplication cellulaire et la diversification tissulaire et l'anthèse, correspondant à l'arrêt de division et l'accumulation d'amidon et d'acides organiques.
- la maturation avec les modifications physiologiques et biochimiques conférant les propriétés organoleptiques du fruit.
- la sénescence pendant laquelle le fruit se dégrade.

1.1.3. Mode de cultures

En agriculture, on distingue différentes pratiques culturales en fonction du matériel, des intrants utilisés, des rendements et des vœux de l'exploitant. On distingue 5 types d'agriculture en fonction des moyens mis en œuvre (Chambre d'Agriculture, 2015) :

- *Agriculture conventionnelle* : elle ne correspond pas à une forme de pratique déterminée mais elle représente l'agriculture la plus employée pour recouvrir les pratiques agricoles. Elle fait partie du savoir-faire de la grande majorité des exploitants agricoles dans les pays développés. Aux yeux du « grand public », elle n'est pas respectueuse de l'environnement et est en opposition à l'agriculture biologique, ce qui n'est pas forcément le cas.
- *Agriculture biologique* : elle est basée sur un mode de production spécifique qui prend en compte les aspects environnementaux (faune et flore), écologique et l'autonomie des exploitants. Elle a comme particularité d'exclure l'usage des produits phytosanitaires de synthèse (dérivés du pétrole), les organismes génétiquement modifiés (OGM). Ce mode de culture vise à assurer le maintien et l'amélioration de la fertilité des sols, respecter et préserver les équilibres naturels. Ces différentes règles constituent un cahier des charges à

l'échelle européen. Des contrôles sont effectués par les 8 organismes certificateurs (Agence Bio, 2015) agréés par l'Institut National de l'Origine et de la qualité (INOA) qui attribuent ou non la certification Agriculture Biologique (AB).

- *Agriculture de précision* : elle met en œuvre toutes les nouvelles technologies disponibles comme le système d'informations géographiques (GPS), informatique... Elle prend en compte les besoins des plantes (apport en eau, nutriments,...), ainsi que l'hétérogénéité des sols et des végétaux présents. Elle permet d'adapter au mieux les différents apports et traitements au sein des parcelles. C'est une version informatisée de l'agriculture raisonnée.
- *Agriculture raisonnée* : elle voit le jour dans les années 50. Le concept est de ne plus traiter de manière systématique contre les ravageurs mais en fonction de seuils de tolérances des cultures face à ces ravageurs. Le ministère de l'agriculture et de la pêche a donné en 2002 une définition : « *l'agriculture raisonnée correspond à des démarches globales de gestion d'exploitation qui visent, au-delà du respect de la réglementation, à renforcer les impacts positifs des pratiques agricoles sur l'environnement et à réduire les effets négatifs sans remettre en cause la rentabilité économique des exploitations. Les modes de productions raisonnées en agriculture consistent en la mise en œuvre de moyens techniques dans une approche globale de l'exploitation. Au-delà des impératifs de sécurité alimentaire des produits agricoles, qui s'imposent à toutes les productions, les modes de production raisonnés peuvent faciliter la maîtrise des risques sanitaires et contribuer à l'amélioration des conditions de travail* ».
- *Agriculture intégrée* : elle est à l'origine nommée « lutte intégrée ». Elle est issue de la « protection intégrée des plantes » qui se base sur la combinaison de lutte biologique et de moyens physiques tels que la rotation des cultures, la résistance des variétés... L'agriculture intégrée est une méthode de production privilégiant les mécanismes de régulation et de ressources naturelles en opposition avec les intrants potentiellement dommageables pour l'environnement. Par rapport à l'agriculture raisonnée, c'est une culture qui prend en compte la diversité et les caractéristiques des espèces en considérant le terrain agricole comme un écosystème en équilibre.

Ces différents types de culture quels qu'ils soient, doivent remplir et respecter un cahier des charges ainsi que des exigences réglementaires. Ils prennent en compte divers aspects aussi bien techniques que sociétales.

Pour chaque type de culture, ces référentiels prennent en compte plusieurs paramètres.

- La connaissance des bonnes pratiques de culture dans leur environnement : les exploitants doivent se tenir informés des techniques agricoles, connaître la géographie de leur

exploitation et de l'environnement (cour d'eau, habitation,...), suivre des formations relatives à l'agriculture et à l'environnement.

- La traçabilité des pratiques : concerne aussi bien les intrants que les pratiques techniques (type de machine, opérateur, raison du traitement,...)
- La santé et la sécurité au travail : mise à disposition d'installation sanitaire, formation du personnel, mise à disposition d'équipement de protection
- La gestion des sols : suivis physico-chimiques des sols pour la maîtrise des amendements
- Les fertilisants minéraux et organiques : condition de stockage, condition d'épandage
- La protection des cultures : stockages des produits phytosanitaires (traçabilité, locaux adaptés, signalétiques), choix des produits phytosanitaires (selon réglementation spécifique du type d'agriculture), matériel de traitement et de préparation
- L'irrigation : la maîtrise de l'eau est de plus en plus prise en compte dans le cas de développement durable

Ces référentiels propres à chaque type de culture sont indispensables et doivent être suivis obligatoirement dans le cas de certification (AB, raisonnée...). Quoiqu'il en soit, les directives concernant l'utilisation des intrants agricoles, fertilisants ou phytosanitaires, doivent être respectées sans manquement car leur non-respect peut entraîner de graves conséquences sanitaires et environnementales.

1.1.4. Utilisation des intrants agricoles et leurs conséquences

Les intrants agricoles ont pour vocation l'augmentation des rendements de production en améliorant les capacités du végétal (engrais) et en luttant contre les espèces (microbiennes, végétales ou animales) dites nuisibles pour la culture (pesticides regroupant les bactéricides et fongicides, les herbicides, les insecticides, rodenticides, les nématicides, les molluscicides ...) (Tableau II).

Tableau II : pesticides chimiques et leurs cibles principales (d'après (Baldi *et al.*, 2013))

Familles chimiques	Exemples de substances actives	Classement selon cible
Organochlorés	DDT, Chlordane, Lindane, Dieldrine, Heptachlore	Insecticides
Organophosphorés	Malathion, Parathion, Chlorpyrifos, Diazinon	Insecticides
Pyréthroïdes	Perméthrine, Deltaméthrine	Insecticides
Carbamates	Aldicarbe, Carbaryl, Carbofuran, Méthomyl	Insecticides
	Asulame, Diallate, Terbucarbe, Trialate	Herbicides
	Benthiavalicarbe	Fongicides
Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe, Thirame, Zinèbe	Fongicides
Phthalimides	Folpel, Captane, Captafol	Fongicides
Triazines	Atrazine, Simazine, Terbutylazine	Herbicides
Phénoxyherbicides	MCPA, 2,4-D, 2,4,5-T	Herbicides
Chloroacétamides	Alachlore, Métolachlore	Herbicides
Pyridines-bipyridiliums	Paraquat, Diquat	Herbicides
Aminophosphonates glycine	Glyphosate	Herbicides

N.B. : Certains pesticides ne sont plus autorisés en France, notamment le DDT (1972) et l'atrazine (2003). La liste des produits est susceptible d'évoluer.

1.1.4.1. Impacts sur l'environnement

La majorité des intrants agricoles est administrée par voie aérienne afin d'obtenir une meilleure dissémination sur les cultures (traitement homogène sur toute la surface aérienne de la plante). L'inconvénient majeur de ce mode d'administration est que selon les conditions météorologiques, les substances peuvent se répandre jusqu'à des centaines de mètres du lieu traité. Ceux qui sont administrés au sol (herbicide) ont un rayon de dissémination moins important. Différents modes de dissémination ont été mis en évidence (Figure 2).

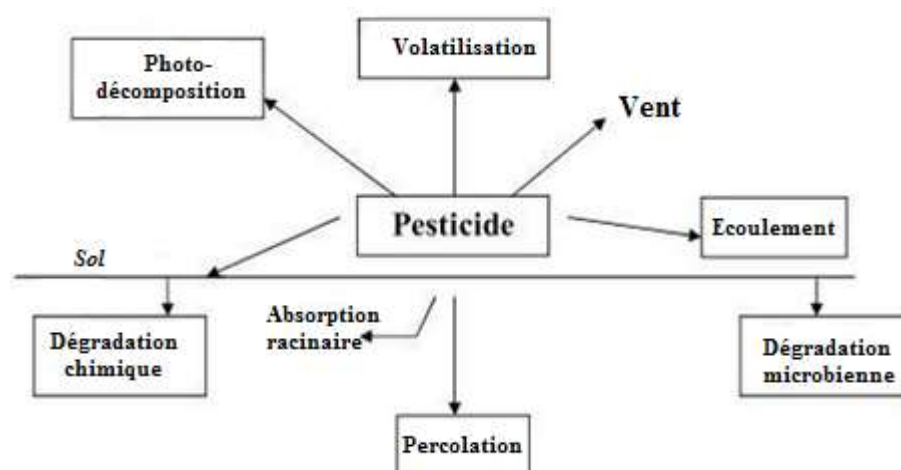


Figure 2 : mode de dissémination des pesticides dans l'environnement (d'après Singh, 2012))

Les pesticides sont des substances destinées à lutter contre les organismes dits nuisibles. Cependant, il n'existe pas de pesticides totalement spécifiques d'une espèce. De par leur emploi, généralement en circuit ouvert, et grâce à leur capacité à se disperser au-delà de la zone de traitement, les pesticides constituent un risque pour les organismes non cibles.

Après leur dégradation, leurs résidus, parfois plus toxiques, vont également être disséminés en ayant des conséquences néfastes sur les systèmes endocriniens de la faune (oiseaux, abeilles, écosystèmes aquatiques,...) (Annamalai and Namasivayam, 2015; McKinlay *et al.*, 2008; Mnif *et al.*, 2011).

Au sein de la chaîne alimentaire, le phénomène de bioaccumulation par la faune et la flore contribue également à la dissémination de ces substances.

1.1.4.2. Impacts sur l'Homme

Depuis les années 1980, des enquêtes épidémiologiques évoquent l'implication des pesticides dans diverses pathologies cancéreuses, neurologiques et de troubles de la reproduction (Baldi *et al.*, 2013). Hormis les intoxications aiguës contractées par les utilisateurs, les principales interrogations et recherches concernent aujourd'hui les effets à long terme pour des expositions à de faibles doses. En effet, les résidus de pesticides retrouvés sur les fruits et légumes (transformés ou non) constituent une part non négligeable d'apport, par voie orale ou cutanée, de ces substances. Des questions sont également posées quant à l'association de plusieurs substances : l'effet cocktail. Les conséquences sont méconnues car l'épidémiologie des populations ayant été exposées à plusieurs molécules est difficile à mettre en œuvre. Des recherches *in vitro* tentent cependant d'élucider les mécanismes d'action (Takakura *et al.*, 2013). L'exposition aux pesticides concerne aussi bien les populations de riverains en périphérie des zones traitées que les individus consommant des produits traités. Il est d'ailleurs présumé que l'exposition à de faibles doses durant la grossesse peut entraîner des malformations congénitales : molécules tératogènes. Par ailleurs, la pomme serait, d'après une étude annuelle de l'ONG Environmental Working Group, l'un des 12 fruits les plus contaminés en pesticides (Environmental Working Group, 2015).

De ce fait, de plus en plus de personnes souhaitent consommer des produits issus de l'agriculture biologique ou raisonnée, où les quantités et/ou certaines molécules sont soit restreintes, soit prohibées.

1.1.5. Récolte et conservation de la pomme

La récolte des pommes s'étend généralement (selon la variété et les conditions climatiques) de septembre à octobre. La pomme étant un fruit climactérique, sa maturation dépend de l'éthylène qui agit comme hormone de maturation. Les pommes sont récoltées avant la crise climactérique pour ralentir le murissement. Ce dernier est défini selon des paramètres physico-chimiques (pH, degré Brix) et biochimique (taux d'amidon).

La cueillette se fait de façon manuelle. Les ramasseurs cueillent les fruits selon des critères définis par l'exploitant. Cela permet un premier tri au verger. Les pommes sont ensuite déposées dans des palox puis sont emmenées à la coopérative (ou centre de tri de l'exploitant). Elles y sont de nouveau triées (aspect esthétique, selon cahier des charges) et calibrées. Elles peuvent être également lavées,

brossées, cirées... puis sont conditionnées pour le stockage ou pour la vente. Ces étapes sont importantes car elles peuvent influencer la durée de vie du produit.

La récolte correspond à un stress pour le fruit, accélérant ainsi les processus de maturation. Une diminution de la fermeté, plus ou moins rapide, est également observée selon les conditions de stockage. On considère que celle-ci est due à une perte d'adhésion intercellulaire induite par les enzymes (les pectine-méthylestérases et les polygalacturonases) dont les actions sont initiées par l'éthylène (Johnston *et al.*, 2002). Rapidement après ramassage, il est alors primordial de contrôler les conditions de stockage pour conserver au maximum les qualités du fruit pendant plusieurs mois.

Lors de la conservation, les fruits sont en phase de maturation. Plus la pomme approche de la maturité, plus sa respiration augmente en association avec l'augmentation de la synthèse d'éthylène (Yang and Hoffman, 1984). L'éthylène est synthétisé par un mécanisme autocatalytique permettant la maturation du fruit. C'est une molécule considérée comme une hormone du fruit qui se fixe à des récepteurs spécifiques, entraînant une cascade de signalisation (Johnson, 2002). Le stockage des pommes pendant plusieurs mois permet aux industriels de la transformation d'être approvisionnés d'une année à l'autre. Il est donc primordial que la conservation se fasse dans de bonnes conditions.

Une diminution de la température entre 0 et 4 °C, permet de limiter les réactions enzymatiques induites notamment par l'éthylène. L'hygrométrie de stockage est également importante pour éviter la déshydratation du fruit. Elle doit être maintenue entre 90 et 95 % (Paull, 1999). D'autre part, le stockage en atmosphère contrôlée inhibe la production d'éthylène et ralentit la respiration (Moras and Chapon, 1983). Les taux en oxygène et en dioxyde de carbone y sont maintenus respectivement entre 2,5 à 3 % et de 2,5 à 4,5 % (Moras and Chapon, 1983). La respiration du fruit est ralentie, réduisant ainsi le métabolisme cellulaire et la consommation de substrats, ce qui permet une meilleure conservation des propriétés physico-chimiques du fruit comme l'acidité et la fermeté (Masias, 1998). Des molécules analogues, agissant comme leurres en se fixant sur les récepteurs à l'éthylène, permettent le ralentissement de la maturation (Crouch, 2001).

Dans l'industrie agronomique et agroalimentaire, les produits sont soumis à des cahiers des charges pour les qualités organoleptiques et à des réglementations pour les qualités sanitaires. C'est également le cas pour les coproduits. Un coproduit est une matière qui est créée au cours du processus de transformation en même temps que le produit principal. Il peut être constitué des écarts de trie, des épidermes et pépins de fruits (cas de la pomme),... En industrie, les coproduits sont de moins en moins traités et considérés comme « déchet ». En effet, l'industriel doit payer une taxe pour éliminer ces résidus de matières premières. La valorisation de ces matières est donc une alternative de choix afin de rentabiliser au maximum la matière première. Par exemple, dans la filière de transformation de la pomme, le raffinage entraîne de grandes quantités de matière secondaire. Pour la compote de pommes et les jus, les rendements de production sont respectivement de 90 % et 70 % du poids initial. Il reste alors entre 10 et 30 % de matières n'ont utilisées. Ces coproduits sont constitués d'épiderme, de chair, des pépins et sont riches en molécules d'intérêt comme les antioxydants. En utilisant des processus d'extraction et de concentration, il devient alors possible de valoriser un « pool » de molécules d'intérêt. Ces dernières peuvent avoir de nombreux débouchés en tant qu'additif, notamment en cosmétique et dans l'industrie agroalimentaire (IAA) (Massias, 2015). Ainsi, il devient primordial d'utiliser des fruits possédant de faibles concentrations en intrants

chimiques qui peuvent être limitant pour la valorisation des coproduits de pommes, d'où l'intérêt de favoriser l'agriculture biologique.

En agronomie, les cultures sont également sources de coproduits potentiellement valorisables. Dans certains cas, des filières spécifiques sont même dédiées aux traitements de ces matières. C'est le cas notamment des produits biosourcés.

1.2. Coproduit d'origine agricole

Les produits biosourcés pour la chimie et les matériaux sont des produits industriels non alimentaires obtenus à partir de matières premières renouvelables issues de la biomasse, comme les végétaux par exemple (ADEME, 2015). Ils s'inscrivent dans une démarche environnementale et écologique dans la mesure où cette filière cherche à réduire notre dépendance aux ressources. Une partie de ces produits biosourcés provient de coproduits de transformation. Deux grandes catégories de produits biosourcés industriels, à usage non alimentaire sont recensées :

- les matériaux (plastiques et composites), principalement destinés aux secteurs du bâtiment, de l'industrie, de l'emballage et des sports et loisirs
- les molécules chimiques (tensioactifs, solvants, lubrifiants...), principalement destinées aux secteurs de la cosmétique, de l'hygiène, des colles, des peintures et de la lubrification en machinerie agricole et forestière

Dans certains cas, les produits biosourcés peuvent être des poudres issues du broyage successif provenant d'une matière première végétale. Ils peuvent avoir de nombreuses applications dans la cosmétique, l'élevage animal, l'industrie des matériaux, la pharmacie,... Pour certaines de ces applications, la bonne qualité microbiologique de cette matière première est indispensable. Même si celle-ci n'est pas destinée à la consommation alimentaire, la non-maîtrise de la flore microbienne peut avoir une incidence, d'une part, sur la fabrication de ces produits biosourcés et de leurs dérivées, et d'autre part, sur leurs utilisations (principalement industrie pharmaceutique).

De part leurs origines végétales, leur faible activité de l'eau (A_w) et leur capacité à se réhydrater, la présence de flore contaminante rend cependant difficile la décontamination de ces poudres. Les principales difficultés pour la décontamination se trouvent dans la nature même des micro-organismes colonisant le produit. Sous forme de spores, ceux-ci sont plus résistants aux traitements assainissants thermiques, par fumigations et aux rayonnements que les cellules végétatives. La nature physique des poudres entraîne des problèmes dans l'homogénéisation des traitements et des diminutions de pénétration de ces agents assainissant au cœur du produit : difficulté pour le passage des gaz, des rayonnements électromagnétiques, isolation vis-à-vis des traitements thermiques.

Le contrôle de la flore microbienne contaminante nécessite donc l'adaptation de techniques d'assainissement pour chaque produit, alimentaire ou non.

2. Qualité du produit

La qualité d'un produit alimentaire comme la pomme peut être évaluée selon plusieurs critères. Dans le cas de fruit comme la pomme, ce sont les qualités alimentaire, technologique, d'usage et de service (Multon, 1994) :

- Qualité alimentaire : prend en compte les aspects sanitaires (avec risques chimiques et microbiologiques possibles pour le consommateur), nutritionnels et organoleptiques (altération du produit). Les règles qui déterminent ces critères sont dépendantes de la finalité à laquelle la matière première est destinée (frais ou transformés) (Codex Alimentarius, 2005).
- Qualité technologique : ce sont les propriétés physico-chimiques de l'aliment qui la régissent. Elle définit l'aptitude à la transformation. Pour exemple, les pommes Golden sont aptes à être cuites, contrairement aux pommes Fuji qui se consomment fraîches (Fruits & Légumes, 2014).
- Qualité d'usage et service : est définie par les applications du produit et dépend des propriétés physiologiques du fruit (climactérique, ...) pour la conservation et le transport. Elle prend en compte les notions économiques, c'est-à-dire les coûts engendrés tout au long de la filière.

Le contrôle global des conditions de ramassage (maturité des fruits, manipulation...), de transport (manutention, température...) et stockage (température, hygrométrie...) est primordial afin de garantir le maintien de ces qualités. En les maîtrisant, la conservation des pommes peut être prolongée de plusieurs mois voire à une année. Ainsi, la transformation et la commercialisation des pommes de table peuvent être étalées tout au long de l'année, sans nécessiter d'importation.

2.1. Principales voies de transformation

Il existe une grande variété de procédés permettant d'augmenter la durée de conservation de fruits. Elle englobe les prétraitements permettant de préparer le produit à la transformation (lavage, pelage,...) ainsi que la mise en œuvre de procédés luttant contre la dégradation du fruit comme le blanchiment, l'ajout d'antioxydant,... (Brat and Cuq, 2007). Ces méthodes industrielles permettent de limiter les facteurs de dégradation du produit et de maîtriser les modifications chimiques ou enzymatiques pendant la transformation et la conservation. Il existe une classification des denrées alimentaires en fonction des modes de conservation et/ou transformation utilisés (Figure 3).

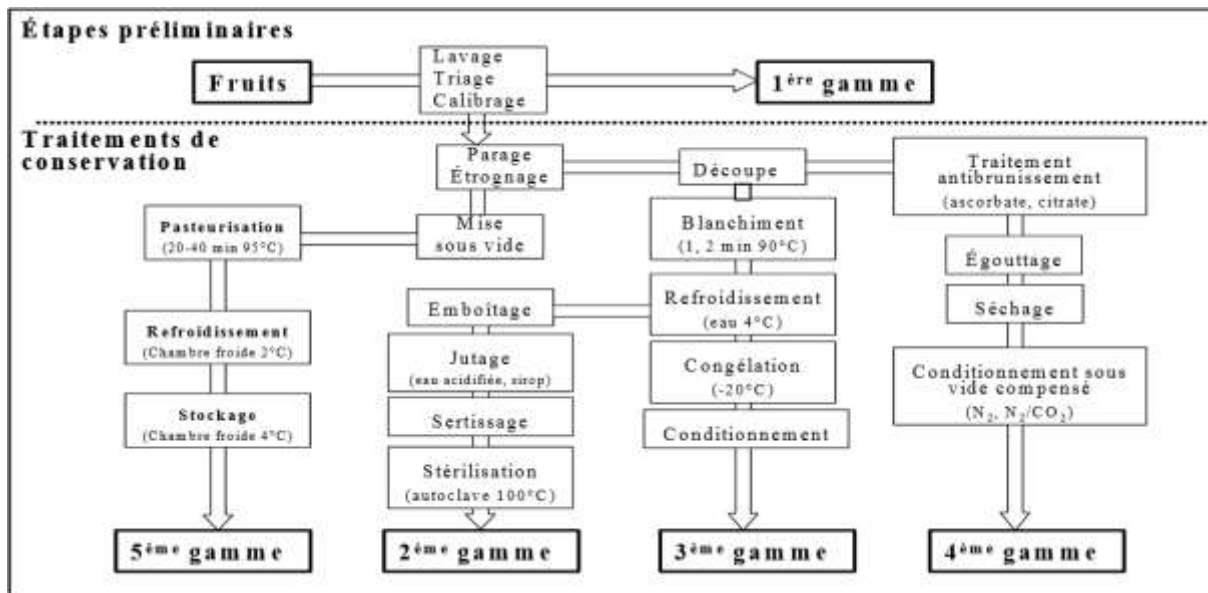


Figure 3 : représentation schématique des différentes voies technologiques utilisables pour la transformation des fruits en préservant leur structure initiale (d'après (Bourles, 2010) adapté de (Brat and Cuq, 2007))

La qualité du fruit, quel que soit sa gamme, sera soumise à des contrôles qualités où seront examinés l'équilibre entre l'acidité et le taux de sucre (pH et °Brix), la couleur (par colorimétrie), le calibre et la texture (texturomètre) (Harker *et al.*, 2008). Dans certains cas, pour les denrées de 1^{ère} gamme mais surtout pour les produits de la 2^{ème} à la 5^{ème} gamme, une étude de vieillissement est nécessaire pour pouvoir contrôler si les procédés de transformation ont été suffisants et si les conditions sanitaires du produit transformé restent celles indiquées dans le cahier des charges. En outre, cette initiative entre dans le plan de maîtrise sanitaire (PMS).

2.2. Microbiologie du fruit

De nombreux travaux ont décrit les éléments contribuant à l'augmentation des maladies dues à la consommation de fruits et légumes (Hedberg, 1996). La surface des fruits sains abritent divers microorganismes faisant partie de la microflore normale (ou commensale) du fruit ou bien introduit accidentellement lors du process (Nguyen-the and Carlin, 1994). Cette flore peut en outre contenir des pathogènes de la plante, des pathogènes opportunistes ou d'autres espèces non pathogènes.

D'après le Centre de contrôle des infections et de préventions, l'agent pathogène n'est pas identifié dans plus de 50 % des cas d'infections suite à la consommation de jus de fruits non pasteurisés. Dans les cas où il est identifié, cet agent pathogène est principalement représenté par *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella* et *Cyclospora* et certains virus. Les *Bacillus cereus* group ont même été présumés agents contaminants pathogènes (Erickson and Kornacki, 2003).

Pour se protéger, Les fruits possèdent des moyens de protections naturelles comme un épiderme pouvant être étanche à l'eau (parfois naturellement recouvert de cire) pour lutter contre les

agressions extérieures (eau, vent, lumière,...) et pour éviter la pénétration de microorganismes. Cette peau abrite à sa surface une grande diversité de microorganismes fongiques ou bactériens. Celle de la pomme est lisse mais présente de nombreuses aspérités permettant les échanges gazeux : les lenticelles. Des études ont montrées que ces zones d'échange étaient susceptibles d'être à l'origine de certaines infections à *Penicillium* sp. (Amiri and Bompeix, 2005; Bompeix, 1968). Il existe plusieurs sources de contamination comme l'air, le sol ou les insectes. Par exemple, le contact du fruit avec le sol, particulièrement avec les composts ou engrais de type fumier peut entraîner une contamination par des pathogènes d'origine humaine de type fécal-oral, comme les entérobactéries (*Enterobacter*, *Shigella*, *E. coli*...) ou les *B. cereus*. Certains virus peuvent également être présents. Pour les champignons, on retrouve à la surface du fruit principalement des moisissures du genre *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Wallemia* ainsi que des levures du genre *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Debaryomyces* et *Pichia*. Ces microorganismes sont restreints à la surface du fruit tant que la peau reste intacte. A partir du moment où une blessure ou coupure apparaît, la protection des tissus est compromise avec pénétration possible des microorganismes. Les nutriments deviennent accessibles, permettant ainsi la multiplication microbienne.

Les flores microbiennes de l'épiderme de pomme ont été étudiées. La flore fongique fait état de la présence de levures, de levures-like et de moisissures. Parmi cette flore, on retrouve principalement *Cryptococcus* sp., *Aureobasidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp., *Sporobolomyces* sp., *Epicoccum* sp., ainsi que *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. et *Acremonium* sp. en plus petites quantités (Andrews and Kenerley, 1978; Chand-Goyal and Spotts, 1996; Doores and Splittstoesser, 1983; Granado *et al.*, 2008; Teixido *et al.*, 1999; Woody *et al.*, 2003). Certains de ces genres, naturellement retrouvés sur les pommes, sont considérés et utilisés comme agent de biocontrôle. Ils jouent un rôle dans l'inhibition de microorganismes potentiellement pathogène pour le fruit et sont plus spécifiques que les fongicides, car ils synthétisent des molécules antimicrobiennes spécifiques de genres microbiens. C'est le cas de *Cryptococcus laurentii* et *C. infirmo-minitans* qui protégeraient la poire de *Penicillium expansum* (Chand-Goyal and Spotts, 1997). Parmi les pathogènes de fruits auxquels la pomme est sensible, on retrouve *Botrytis cinerea*, *P. expansum* et *Mucor piriformis* (Caccioni and Guizzardi, 1992). Ces espèces peuvent aussi être responsables de la synthèse de mycotoxine. *Rhodotorula glutinis* permettrait de réduire les infections à *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* (Benbow and Sugar, 1999; Helbig, 2001).

Les mycotoxines sont des substances toxiques synthétisées par les champignons de type moisissure. Certaines ne sont pas détruites lors des traitements thermiques. De ce fait, le contrôle de la flore présente sur le produit est primordial pour se prémunir de ces molécules. Une fois synthétisée dans le fruit, aucun traitement thermique ne pourra éliminer complètement le danger. Le choix de la méthode de culture est susceptible d'influencer la présence de microorganismes producteurs. Les céréales, les arachides et les noix représentent les cultures les plus contaminées par ces mycotoxines alors que les fruits et légumes ne sont que très peu affectés. Les principales classes de mycotoxines sont les aflatoxines, les trichothécènes et les fumonisines.

Parmi les mycotoxines, la patuline est la plus problématique dans le commerce de la pomme. Elle possède une faible masse moléculaire (Figure 4) et est produite par différentes espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et *Paecilomyces*. Cependant, l'espèce la plus rencontrée dans le cadre de produits destinés à la consommation humaine est *P. expansum*. Elle peut causer chez l'Homme dans le meilleur des cas des désordres gastro-intestinaux (Mahfoud *et al.*, 2002).

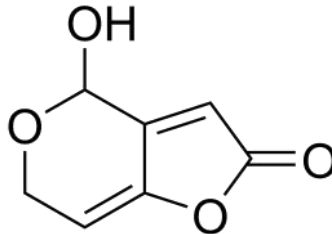


Figure 4 : représentation schématique de la patuline

2.3. Flore microbienne des produits transformés

Après la récolte, divers procédés sont mis en place pour maintenir au maximum les qualités physico-chimiques et organoleptiques du produit. Pour les produits frais non transformés, un minimum d'étapes est en général réalisé. Les fruits bruts après cueillette peuvent être lavés, coupés en morceaux, pelés et/ou emballés dans le but de rendre le produit directement consommable. Ces étapes rendent alors accessibles aux flores microbiennes le contenu interne des fruits qui n'est plus protégé par la barrière physique que lui offrait l'épiderme. De plus, le lavage / rinçage des fruits dans des bains d'eau, la plupart du temps recyclée (d'où accumulation de charges microbiennes), peut entraîner des surcontaminations par certains microorganismes pathogènes tels que *E. coli* O157 :H7, *Enterobacter*, *Shigella*, *Salmonella sp.*, *Cryptosporium parvum*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora caytanensis*, *Toxoplasma gondii* (Hui, 2008).

Dans la flore commensale du fruit, des organismes osmophiles, osmotolérants, xérophiles et xérotolérants sont souvent détectés (Jasser, 2010; Pitt, 1975). Il est également possible de trouver des organismes capables de former des endospores comme *Bacillus sp.* ou *Clostridium*. Ces spores peuvent résister au processus de stérilisation en fonction de la composition et la nature du produit : forte teneur en sucre, faible activité de l'eau.... Elles sont également retrouvées après pasteurisation de jus de fruit (ou nectar). Dans ces cas, le process va avoir une influence directe sur la sélection des formes de résistance (Walls and Chuyate, 2000). En effet, les cellules végétatives seront détruites par le traitement alors que les spores y résisteront.

En agroalimentaire, il existe un compromis entre le risque sanitaire et la préservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques du produit. Ce compromis dépend du cahier des charges et de l'état sanitaire. Le risque est d'abord fonction de la qualité microbiologique de la matière première. Plus celle-ci est contaminée, plus le traitement assainissant est sévère, entraînant une altération excessive des qualités du produit (Mahfoud *et al.*, 2002).

Devant les exigences accrues du consommateur vis à vis des qualités sanitaires des produits alimentaires, les industriels cherchent, de plus en plus, à appliquer des normes et à être certifiés en s'appuyant sur des référentiels et des méthodes.

3. Procédés assainissants

Dans l'IAA, il existe de très nombreux procédés permettant de limiter, de diminuer ou d'éliminer les microorganismes présents sur le produit brut, en cours de transformation ou transformé. Chaque type de procédés est choisi en fonction de la faisabilité industrielle, du but recherché et de la matrice à traiter.

3.1. Traitement thermique

Les traitements thermiques sont largement répandus pour maîtriser la charge microbienne et permettent la conservation des aliments (Farkas *et al.*, 2007). Ils ont pour rôle principal la destruction des microorganismes. L'efficacité d'inactivation du traitement est dépendante du barème appliqué : couple temps / température. Plusieurs paramètres et facteurs peuvent avoir une influence sur l'action d'inactivation (Hansen *et al.*, 1998), comme l'activité de l'eau (Gaillard *et al.*, 1998), la teneur en protéines et en lipides (Kaur *et al.*, 1998; Sugiyama, 1951) ainsi que le pH (Davey, 1993).

Les traitements thermiques ont aussi pour objectif l'inhibition des enzymes responsables de la dégradation du produit. C'est notamment le cas des polyphénoloxydases (PPO) et des peroxydases (POD) qui sont responsables du brunissement. Massias (2015) s'est intéressé à l'incidence des prétraitements, notamment le blanchiment et la pasteurisation, la conservation des capacités antioxydantes de la pomme en inactivant les PPO et POD. Comme pour les microorganismes, le barème est directement lié à l'efficacité d'inactivation de ces enzymes (Aka *et al.*, 2013; Buckow *et al.*, 2009).

Cependant, ces traitements thermiques doivent remplir leur fonction d'assainissement tout en préservant au maximum les molécules d'intérêt (polyphénols, vitamines,...). Le barème choisi doit donc être un compromis entre sécurité sanitaire et conservation des propriétés nutritionnelles et organoleptiques. Par ailleurs, il existe des outils informatiques prévisionnelles permettant d'anticiper l'impact des traitements thermiques sur la flore microbienne et les vitamines (Geeraerd *et al.*, 2005; Sym'Previus, 2015).

Les traitements thermiques se déclinent principalement sous deux formes :

- La pasteurisation : c'est un traitement à température modérée ne dépassant pas les 100 °C. Elle a pour but la destruction de la totalité des microorganismes pathogènes sous formes végétatives et seulement une partie de la flore dite banale. La pasteurisation est souvent associée à d'autres moyens de conservation : réfrigération, emballage hermétique, addition d'acide...
- La stérilisation : c'est un traitement à de fortes températures supérieures à 100 °C. Elle permet de façon générale la destruction des microorganismes pathogènes, de certaines toxines et de la flore banale.

En matière d'assainissement des fruits, les traitements thermiques ont toujours été utilisés. Ils interviennent dans la lutte contre les insectes et le dépérissement induit par les microorganismes. Il existe trois méthodes de traitement des produits à la chaleur : l'eau chaude, la vapeur et l'air chaud. L'eau chaude est surtout utilisée pour lutter contre les champignons. La vapeur et l'air chaud sont utilisés pour le contrôle des champignons et des insectes. Ces différentes applications sont dépendantes de la matrice alimentaire.

La vapeur est très utilisée à hautes températures et hautes pressions pour le traitement de surface inerte (plan de travail, matériel de découpe,...). L'efficacité de ce type de traitement réside d'une part, dans l'effet mécanique de la vapeur sous pression (4 à 5 bar) qui permet le décrochage des microorganismes, et d'autre part, l'effet thermique de la vapeur d'eau sur les microorganismes (140 à 165 °C) (Song *et al.*, 2012; Tanner, 2009). Des traitements avec de tels paramètres ne sont pas envisageables pour les fruits et légumes, car les conséquences sur l'intégrité du produit seraient importantes (phénomènes de cuisson, brunissement, pertes de texture...). Ainsi, des traitements vapeur basse température (< 100 °C) ont été envisagés. Ils consistent à exposer le fruit avec une vapeur saturée en eau. L'énergie thermique est transférée par condensation à la surface du fruit plus froide (Lurie, 1998).

Maxin *et al.* (2012a, 2012b) ont montré les effets de la température de l'eau sur la germination des spores et sur la pourriture due à *P. expansum*, *Neonectria galligena* et *B. cinerea*. Après contamination des pommes par des spores de champignons (*Challenge test*), les pommes sont plongées dans des bacs d'eau chaude à des températures comprises entre 32 °C et 70 °C, pendant 3 min puis conservées en chambre froide. Les résultats ont montré une inhibition du développement de *B. cinerea* chez des pommes traitées dans des bains de plus de 48 °C ainsi qu'une inhibition du développement de *N. galligena* entre 51 °C et 53 °C. Une inhibition significative de développement de *P. expansum* a été obtenue entre 47 °C et 52 °C avec une efficacité maximale de 82 %. Par ailleurs, il a été observé, au cours du stockage, des lésions sévères sur les pommes traitées pendant 3 min à 52 °C et des nécroses à des températures de 70 °C (Maxin, 2012; Maxin *et al.*, 2012a, 2012b).

Juneja *et al.* (2002) ont rapporté l'impact des traitements sur la couleur et la texture. D'après leurs résultats, le traitement de pommes, dans de l'eau à température supérieure ou égale à 65 °C, a induit leur brunissement. Un traitement à 80 °C pendant plus de 30 sec a modifié la fermeté des couches supérieures de la pulpe du fruit.

De nombreux mécanismes d'action de la chaleur ont été mis en évidence. La chaleur peut provoquer des altérations de la paroi cellulaire avec formation de pores, la dénaturation des protéines et la destruction des mitochondries (Bischof *et al.*, 1995; Schirra *et al.*, 2000). Un effet fongistatique serait également observé et lié au choc thermique (effet indirect). Ce choc thermique induit par stress l'activation des PRP (*pathogenesis related proteins*) chez le végétal tels que des chitinases et des β -1,3-glucanases et éventuellement des substances phytoalexiques qui ont des effets antimicrobiens (Schirra *et al.*, 2000). Cette résistance acquise disparaît en cas de traitement à trop fortes températures (destruction des tissus) (Fallik, 1996).

3.2. Traitement à l'ozone

3.2.1. Chimie de l'ozone

L'ozone est une molécule composée de 3 atomes d'oxygène possédant une masse moléculaire de 47,98 g / mol. A température ambiante et à pression atmosphérique, l'ozone se présente sous forme gazeuse, plus stable que la forme liquide ou solide, de couleur bleuâtre. Son action antimicrobienne est connue depuis plus d'un siècle (Franklin, 1914). C'est un oxydant très puissant qui a une capacité oxydante 1,5 fois plus élevée que le chlore (Figure 5). Il est efficace aussi bien sous forme gazeuse que sous forme dissoute dans l'eau. L'ozone est principalement utilisé pour le traitement de l'eau potable. Il ne peut pas être stocké à cause de son instabilité et sa production doit être effectuée sur site grâce à un générateur.

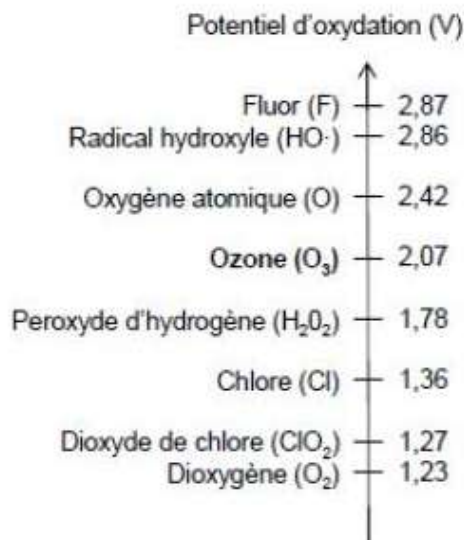


Figure 5 : potentiel d'oxydation de composés oxydants

3.2.2. Paramètres influençant la durée de vie

Plusieurs paramètres peuvent influencer la durée de vie de l'ozone. En jouant sur ces paramètres, il est possible d'augmenter la demi-vie de l'ozone, que ce soit dans l'air ou dans l'eau.

3.2.2.1. La température

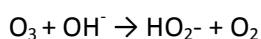
La température est l'un des facteurs les plus importants. Elle régit non seulement la concentration maximale de l'ozone dans l'eau, mais aussi sa demi-vie. Par exemple, une eau pure à température ambiante (20 °C) peut posséder une concentration en ozone comprise entre 1 et 20 mg / L d'ozone alors que la même eau à 4 °C peut avoir des concentrations comprises entre 30 et 40 mg / L (Rodier *et al.*, 2009). De ce fait, la solubilité de l'ozone dans l'eau décroît avec l'augmentation de la température. Il est également moins stable (Kim *et al.*, 2003). Sa vitesse de réaction augmente d'ailleurs d'un facteur 2 à 3 tous les 10 °C. Le Tableau III résume les temps de demi-vie de l'ozone gazeux ou dissous en fonction de la température.

Tableau III : temps de demi-vie de l'ozone gazeux ou dissous dans l'eau (pH 7) en fonction de la température (d'après (Okafor, 2011))

Air		Dissous dans l'eau (pH 7)	
Température (°C)	Demi-vie	Température (°C)	Demi-vie
-50	3 mois	15	30 min
-35	18 jours	20	20 min
-25	8 jours	25	15 min
20	3 jours	30	12 min
120	1,5 h	35	8 min
250	1,5 sec		

3.2.2.2. Le pH

Lors de sa décomposition, l'ozone forme des radicaux hydroxydes dont la concentration augmente avec le pH (Figure 6).



La Figure 6 montre la décomposition de l'ozone avec différentes concentrations initiales en fonction du pH. On remarquera qu'à des pH supérieur à 8, la concentration en ozone dissous est fortement influencée.

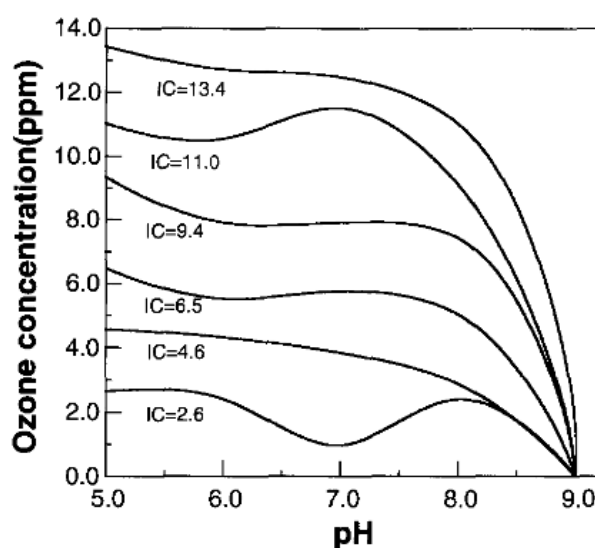


Figure 6 : stabilité de l'ozone dans du tampon phosphate à différentes valeurs de pH à 20 °C ; IC = concentration initiale calculée (d'après (Kim *et al.*, 2003)).

3.2.2.3. Les matières dissoutes

L'ozone en solution peut réagir avec différentes matières en suspension, tels que les composés organiques, les microorganismes... Ainsi, la décomposition de l'ozone qui réagit sous l'effet de ces substances entraîne la formation de sous-produits (néoformés) et de radicaux OH. La nature de la matière dissoute, elle peut accélérer par réaction en chaîne (par des substances promotrices) ou ralentir ces réactions. La qualité de l'eau joue donc un rôle prépondérant dans la durée de vie de l'ozone (Kim, 1998).

3.2.3. Réactivité chimique

Les ions carbonates sont des inhibiteurs de la réaction de décomposition de l'ozone. En effet, ils réagissent avec les ions hydroxydes qui ne sont plus disponibles pour réagir avec l'ozone. En revanche, la matière organique dissoute sera promotrice de la décomposition. L'ozone va rapidement réagir avec elle, en oxydant les doubles liaisons, les composés aromatiques, les groupements amines et les composés soufrés.

Par son action directe, la molécule d'ozone agit par oxydation par cycloaddition sur des liaisons carbone-carbone insaturées. Cette réaction, appelée ozonolyse, est donc sélective et à l'origine de la formation d'un ozonide primaire puis secondaire, composé très instable. L'hydrolyse de ces composés aboutit à la formation d'aldéhydes ou de cétones qui sont des composés organiques résiduels biodégradables (Figure 7).

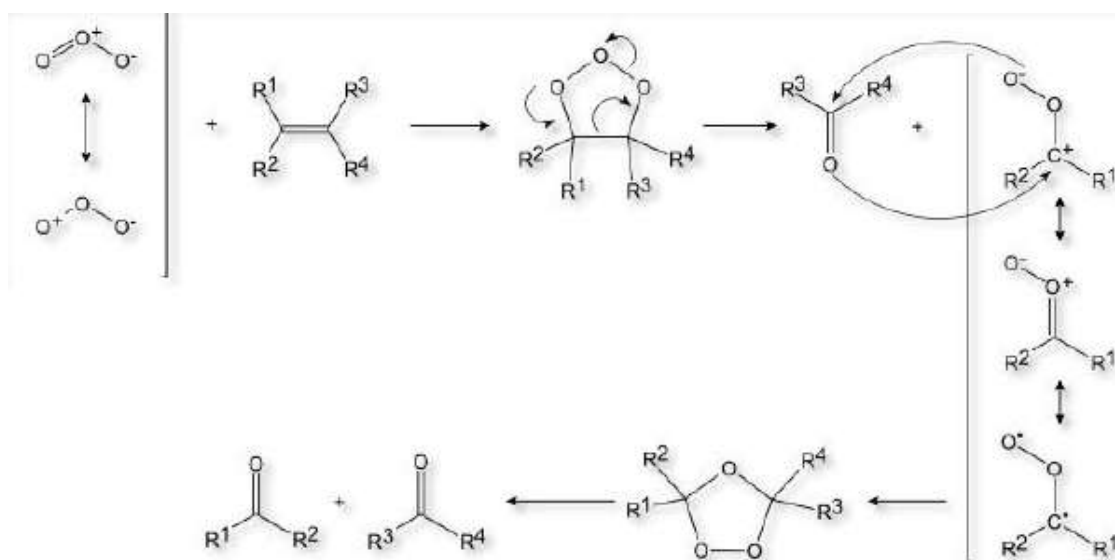


Figure 7 : réaction d'ozonolyse sur les liaisons insaturées

Cependant l'ozonolyse peut générer des composés très toxiques notamment en présence d'ions bromure. En effet, en présence des ions bromures, l'ozone produit de l'hypobromite (BrO^-) qui peut se transformer en ion Bromate (BrO_3^-), considéré comme cancérigène et dont la limite de consommation est fixée à $10 \mu g / L$ (directive européenne du 30/05/95). De plus, l'ion hypobromite

est en équilibre avec l'acide hypobromeux (BrOH), qui en réagissant avec de la matière organique, donne des dérivés organobromés dont le bromoforme, également cancérigène.

La haute réactivité de l'ozone et son pouvoir oxydant ne sont pas attribués uniquement à la molécule en elle-même mais également aux radicaux libres qu'elle engendre (Manousaridis *et al.*, 2005). En effet, la molécule d'ozone est très instable aussi bien sous forme gazeuse que dissoute et elle se décompose en hydroxyle (HO^\bullet), peroxyde d'hydrogène (.HO_2) et en radical superoxyde (.O_2^-). Ces molécules très réactives participent alors à l'activité oxydante de l'ozone. En fin de réaction, l'ozone et ses radicaux reforment de l' O_2 ainsi que de l'eau (H_2O).

3.2.4. Action sur les microorganismes

Le traitement par l'ozone a un effet désinfectant à large spectre. Il agit comme bactéricide, fongicide, sporocide et virucide. De plus, il est capable, contrairement au chlore, de détruire des kystes d'amibes libres, formes de survie des protozoaires dans un environnement défavorable et donc très résistantes (Dosti *et al.*, 2005). La sensibilité d'un microorganisme peut varier selon l'espèce microbienne, l'âge de la culture et la densité de la population. La réduction du nombre de germes est généralement fonction de la concentration C en ozone (en mg/L ou ppm) et du temps de contact, T (en min). On parle alors de « CT » nécessaire à la destruction des germes, exprimé en UFC / mL, lors d'une application continue et constante d'ozone.

La formule est :

$$C \times T = K \times \log (\text{UFC (initial)} / \text{UFC (final)})$$

K est une constante qui dépend du produit traité, du milieu véhiculant l'ozone, du germe, de la température et de l'humidité.

D'après cette équation, nous constatons que, pour une efficacité identique, la durée du traitement est fonction de la concentration de l'ozone. En effet, un traitement d'une minute à 3 ppm d'ozone permet l'obtention d'un effet bactéricide identique à un traitement de 3 min à 1 ppm.

Broadwater *et al.* (1973) ont démontré qu'à de très faible concentration, l'ozone a un effet bactéricide très puissant. En effet, ils ont calculé que la dose minimale létale d'ozone appliquée pendant 5 min était de 0,12 mg / L pour *B. cereus* et de 0,19 mg/L pour *E. coli* et *Bacillus megaterium*.

Cependant, Restaino *et al.* (1995) ont montré que la majorité des bactéries aussi bien GRAM (+) que GRAM(-) présentent une courbe de destruction biphasique par l'ozone. L'effet bactéricide de l'ozone commence par une étape de destruction rapide suivie d'une étape plus lente de 5 min à une concentration comprise entre 0,15 et 0,2 mg / L. Ceci s'explique par une augmentation, dans le milieu, de matières organiques dues à la destruction des premières bactéries. Ces matières organiques représentent à la fois un obstacle physique et un obstacle chimique entraînant une diminution de l'ozone libre. Par conséquent, elles augmentent les radicaux libres dans le milieu. Il est donc conseillé d'avoir le minimum de matière organique dans le milieu véhiculant l'ozone au début du traitement pour ne pas gêner son action bactéricide.

De plus, Restaino *et al.* (1995) ont montré que les bactéries GRAM (+) sont plus sensibles à l’ozone que les bactéries GRAM (-). Aussi, l’ozone est efficace contre les agents de putréfaction (*Pseudomonas aeruginosa* et *Zygosaccharomyces bailii*), les contaminants d’origine fécale (*Enterococcus faecalis* et *E. coli*) et les agents pathogènes d’origine alimentaire (*Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* et *Staphylococcus aureus*). Par ailleurs, des travaux ont montré que l’eau ozonée avait la capacité de désinfecter des biofilms en disloquant la matrice d’exopolysaccharides, rendant ainsi les cellules plus accessibles (Tachikawa *et al.*, 2009).

Le mécanisme d’action bactéricide de l’ozone a fait l’objet de nombreuses études, notamment sur *E. coli* (Cho *et al.*, 2010; Komanapalli and Lau, 1996), *S. aureus* et les spores de *Bacillus subtilis* (Zhang *et al.*, 2011). Toutes ces études montrent que l’ozone détruit les microorganismes par une lyse cellulaire en agissant sur la membrane les acides gras insaturés, les protéines membranaires (Diao *et al.*, 2004; Levine, 2002; Murray *et al.*, 1965), les glycolipides et glycoprotéines (Guzel-Seydim *et al.*, 2004). Ceci a été démontré, par la mesure de la concentration des ions K⁺ et de l’ATP comme marqueur de dommages cellulaires (Liu *et al.*, 2010). L’ozone pourrait aussi dénaturer les protéines cytoplasmiques, soit par des réactions d’addition de sous-produits de la peroxydation lipidique comme le 4-hydroxynonénal, soit par clivage de la chaîne peptidique induisant une réduction de l’activité enzymatique. Enfin, l’ozone peut également réagir avec les acides nucléiques (Komanapalli and Lau, 1996).

Cependant, Zhang *et al.* (2011) ont montré que la lyse cellulaire n’affecte pas *Ps. aeruginosa* même si l’observation d’une augmentation de la concentration de K⁺, Mg²⁺ et ATP dans le milieu extracellulaire était notée. Dans ce cas l’effet de l’ozone porte sur les protéines formant les canaux K⁺ provoquant une hausse de la perméabilité membranaire au K⁺. La hausse de Mg²⁺ est expliquée par la propriété de l’ozone à endommager les polysaccharides et la hausse de la concentration de l’ATP n’est pas encore clairement expliquée. Cependant, cela prouve que l’ozone altère considérablement la perméabilité membranaire. Cette fuite membranaire va ensuite être ralentie par un phénomène de coagulation cytoplasmique mais qui va inactiver définitivement la bactérie (Zhang *et al.*, 2011).

3.2.5. Effet de l’ozone sur les propriétés organoleptiques du produit

L’ozone est efficace contre les microorganismes et des molécules résiduelles non désirées. Cependant, il peut avoir dans certains cas un impact sur les propriétés organoleptiques du produit. En effet, de nombreuses études ont montré qu’il pouvait avoir une incidence sur la coloration du produit, oxyder la surface et provoquer des odeurs indésirables (Khadre *et al.*, 2001).

L’ozone par son activité oxydante peut également avoir des conséquences sur la teneur en antioxydant du produit (polyphénols, vitamine C,...). De nombreuses études ont été menées sur le sujet et donnent des résultats parfois contradictoires. Le lavage à l’eau ozonée n’aurait pas d’effet sur la teneur en composés phénoliques de la laitue iceberg (Beltrán *et al.*, 2005). En revanche, il aurait un effet sur la teneur en vitamine C chez la laitue (Beltrán *et al.*, 2005) mais permettrait son

augmentation chez la fraise (Pérez *et al.*, 1999). Ces derniers rapportent également que la teneur en anthocyanine (polyphénol) ne serait que peu affectée.

D'un point de vue sensoriel, il semblerait qu'un stockage au froid sous atmosphère modifiée à l'ozone entraînerait une perte réversible des arômes chez la fraise (Nadas *et al.*, 2003). Ce phénomène viendrait de l'oxydation des composés volatils.

Des études ont montré que certains pesticides peuvent être dégradés par l'ozone (J. G. Wu *et al.*, 2007) alors que d'autres études indiquent que les composés néoformés peuvent être plus toxiques que les molécules parentes (Wu *et al.*, 2009). Il peut également oxyder les lipides, protéines, vitamines et molécules antioxydantes comme les polyphénols (Torres *et al.*, 2011). Cependant, des études ont montrées qu'un traitement à l'ozone gazeux en atmosphère modifiée avec de l'ozone permettait l'augmentation de la quantité de polyphénol totaux chez la banane et l'ananas (Allothman *et al.*, 2010). Cette augmentation serait déclenchée par le stress induit par l'ozone.

3.2.6. Mode de production d'ozone

L'ozone peut être fabriqué sous forme gazeuse par 2 procédés à partir de molécules d'oxygène :

- (1) Procédé photochimique : irradiation des molécules d'O₂ par un rayonnement UV
- (2) Procédé à décharges électriques : transformation des molécules d'O₂ en O₃ lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique intense : la décharge corona

D'autres méthodes beaucoup moins répandues existent également et font intervenir des techniques électrolytique, chimique (oxydation du phosphore), thermique et radiochimique mais ces méthodes ne sont pas économiques et parfois dangereuses (Heim and Glas, 2011).

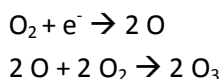
(1) Procédé photochimique

Pour ce procédé, une lampe UV basse pression au mercure est utilisée. Le spectre d'émission de ce type de lampe possède deux bandes intenses aux longueurs d'ondes 185 nm et 254 nm (Voronov, 2008). Pour la fabrication du gaz, la longueur d'ondes 254 nm n'a aucune utilité. Ce sont les photons émis à 185 nm qui possèdent assez d'énergie pour transformer les molécules d'O₂ en ozone. Pour ce faire, un flux de gaz, en général de l'air ambiant, passe à l'intérieur d'une cellule où il est irradié par la lampe. Sous l'effet de la haute-énergie des photons ($\lambda_{185 \text{ nm}}$), un petit pourcentage d'O₂ est photodissocié en radicaux O. Cette molécule très instable se réassocie alors en molécule d'O₂ et O₃ (Dohan and Masschelein, 1987). On notera que les lampes UV commerciales (« tout public ») en quartz ne sont pas capables de former des molécules d'ozone car la présence d'impureté dans la lampe masque le spectre UV dans les longueurs d'ondes utiles (185 nm).

(2) Procédé à décharges électrique

Les molécules d'ozone sont produites sous l'effet de décharges électriques de fortes intensités. Un gaz (air ambiant ou enrichi en O₂) débarrassé de son humidité, de poussières et d'huiles passe dans une chambre où se trouvent 2 électrodes. Sous l'effet d'une très forte décharge électrique, la

décharge corona, les molécules d'O₂ se dissocient en radicaux O. Comme pour la synthèse UV, les atomes d'oxygène se réassocie avec des molécules d'O₂ pour former de l'ozone.



Les décharges répétitives de quelques nanosecondes entraînent un échauffement du gaz et de la chambre de réaction. Il est donc nécessaire de doter le générateur d'un système de refroidissement.

Quelque soit le procédé de fabrication, il est possible d'augmenter les rendements de production d'ozone (jusqu'à 18 %) en utilisant de l'air enrichi en O₂ ou directement de l'oxygène pur (Tableau IV).

Cependant, l'ozone produit doit être dissous dans l'eau ou mélangé avec de l'air.

Tableau IV : comparaison des deux méthodes de production d'ozone (d'après (O'Donnell *et al.*, 2012))

Paramètres	Procédé photochimique	Décharge corona
Rendement de production maximale	1,94 g / kWh avec lampe à mercure	55 g / kWh
Concentration d'ozone en sortie	1,8 g / m ³ ~ 0,14 % du poids	12 – 60 g / m ³ ~ 0,1 – 4,8 % du poids
Energie requis pour fabriquer 1 kg d'ozone	44 kWh	6 – 8 kWh
Besoin en alimentation en gaz sec	Conseiller mais pas indispensable	Indispensable
Constance de la production	Variable	Constant
Coût d'achat	Plutôt faible	Plutôt élevé
Coût de fonctionnement	Elevé	Faible

3.2.7. Techniques de dissolution de l'ozone dans l'eau

La dissolution de l'ozone dans l'eau est un point majeur pour un traitement efficace. De nombreux facteurs peuvent influencer sa concentration en solution. Les conditions de pression et de température notamment impact l'équilibre phase gazeuse / phase aqueuse ([Paramètres influençant la durée de vie](#)). La Figure 8 présente l'influence de la pression sur la quantité d'ozone dissous dans une eau à 15 °C.

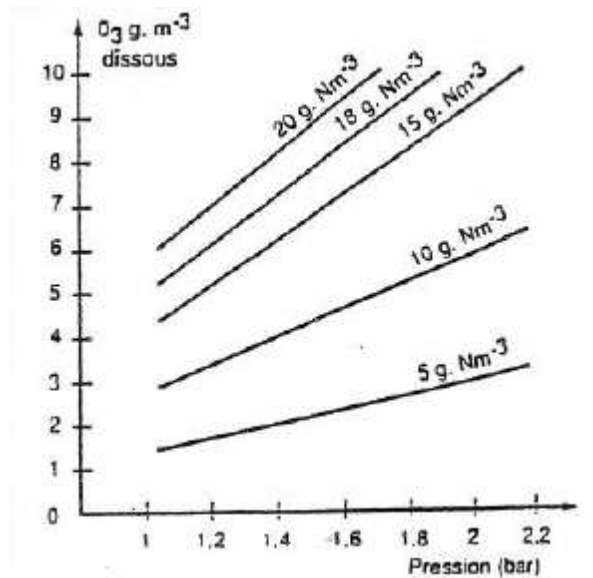


Figure 8 : influence de la pression et de la concentration du gaz vecteur sur la solubilité de l’ozone dans l’eau à 15 °C (d’après (Rodier *et al.*, 2009))

Il existe deux types de système permettant la dissolution d’un gaz dans une solution liquide.

3.2.7.1. Diffuseur

L’utilisation d’un fritté est la technique la plus simple pour dissoudre un gaz dans un liquide. Il consiste à faire passer le gaz dans un diffuseur poreux en céramique ou en inox immergé dans le fond d’un bac contenant l’eau à ozoner. La pression de gaz doit être supérieure à la pression hydrostatique. L’augmentation de la dissolution de l’ozone est dépendante de la hauteur d’eau et de la surface d’échange. Plus les bulles sont fines, plus leur surface d’échange (par rapport à leur volume) est importante. De même, les bulles les plus fines sont également les plus lentes à remonter à la surface. Leur temps de contact est donc plus long que pour les bulles plus grosses. Les frittés en céramique ou en inox engendrent des bulles qui font une taille généralement comprise entre 5 μm jusqu’à 5 millimètres de diamètre. Même si les diffuseurs possèdent des tailles de pores définies, il est difficile de prédire la taille des bulles qu’ils pourront former car cela dépend d’une part de la pression de gaz arrivant au diffuseur ainsi que de la pression exercée par l’eau. C’est pour cela qu’un système possédant une colonne d’eau importante sera plus efficace mais la pression de gaz devra être augmentée.

3.2.7.2. Le venturi

Un venturi est composé de deux parties (Figure 9) : d’un bec d’admission où la vitesse du liquide porteur (eau) est accélérée et d’une section où le diamètre se réduit (gorge) puis repasse à taille normale.

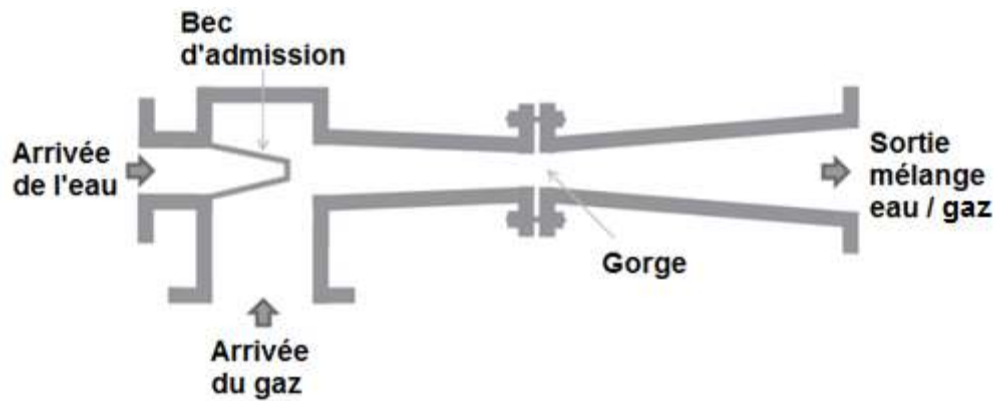


Figure 9 : schéma du système Venturi

Quand la phase liquide arrive dans le venturi, le flux se retrouve comprimé entre la chambre d'injection et le jet de gaz. En passant dans la gorge, le débit de liquide va augmenter et la pression diminuer. Enfin, la pression réaugmente à la sortie du venturi. Ce phénomène de dépression / pression entraîne une nébulisation (fines bulles) du gaz dans le liquide turbulent. Pour augmenter le rendement, il est possible d'ajouter en sortie de venturi une colonne d'eau permettant d'augmenter le temps de contact entre la phase liquide et la phase gazeuse. Tous ces équilibres sont régis par la loi d'Henry où la pression partielle du gaz dissous est directement liée à la pression partielle de la phase gazeuse. Il y a cependant quelques biais à cette loi car elle n'est applicable qu'aux gaz dit « idéaux » (qui ne réagissent pas avec l'eau).

3.2.8. Application de l'ozone en agroalimentaire

Hormis les applications pour le traitement de l'eau potable, l'ozone a de nombreuses débouchées dans l'agroalimentaire, variables selon la législation des pays. L'ozone sous forme gazeuse ou dissoute est utilisé pour la désinfection de produits de la mer (Naito and Takahara, 2006), des céréales (Dubois *et al.*, 2006), les produits carnés (Castillo *et al.*, 2003) mais aussi les fruits et légumes par traitement sous atmosphère contrôlée (Najafi and Khodaparast, 2009) ou par lavage à l'eau ozonée (Gil *et al.*, 2009).

L'utilisation de l'ozone, du fait de son instabilité, nécessite certaines précautions d'usage. Il n'est pas rémanent dans le produit mais sa toxicité lors de son utilisation en fait un danger. De ce fait, l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité), organisme généraliste en santé et travail (INRS, 2015), préconise pour les personnes des Valeurs Moyennes d'Exposition (VME) de 0,1 ppm (≤ 8 h par jour) et des Valeurs Limites d'Exposition (VLE) de 0,2 ppm (≤ 15 min par jour) (INRS, 2004a, 2004b). Les installations utilisant l'ozone dans leur process doit être classée comme « établissement dangereux » selon le décret du 20 Mai 1953, modifié en 2002 (Décret n°53-578, 1953).

3.2.8.1. Ozone dissous

L'ozone dissous dans l'eau est utilisé pour le lavage de surface, aussi bien des produits que de l'environnement (plan de travail, paroi des chambres froides,...) et des emballages. L'ozone en phase aqueuse est une alternative aux produits chlorés pour le lavage et le contrôle des pathogènes de surface. Il peut également être utilisé pour le recyclage de l'eau ou la désinfection d'eau entrant dans la composition des produits transformés. Le lavage des légumes coupés par de l'eau ozonée permet d'augmenter la durée de vie de ces produits tout en réduisant la charge microbienne (Beltrán *et al.*, 2005). Il en est de même sur les produits bruts comme les pommes contaminés à *E. coli* O157 : H7 (Achen and Yousef, 2001). En plus d'être actif sur les microorganismes, l'ozone permet également de détruire certains résidus de pesticides présents à la surface des fruits et légumes. J. Wu *et al.* (2007) ont rapporté que des traitements à l'ozone dissous de l'ordre de 1,4 ppm pendant 15 min permettaient de réduire de 27 à 34 % les résidus de pesticides. De même, les substances fongiques comme l'aflatoxine B1 sont elles aussi sensibles et pouvaient être réduites (Inan *et al.*, 2007).

Cependant, pour que le traitement soit efficace, il faut veiller à ce que l'eau de lavage ne soit pas très chargée en matières organiques ou en résidus de fruit. En effet, tous ces éléments réagiront avec l'ozone, diminuant ainsi la concentration de celui-ci et donc l'efficacité du traitement. De plus, les microorganismes peuvent se trouver protégés par les éléments cités (Karaca, 2010) (Tableau V).

3.2.8.2. Ozone dans l'air

Pour le traitement des fruits et légumes, l'ozone gazeux peut être utilisé pour le stockage en atmosphère modifiée. Cela permet l'élimination des odeurs mais également de contrôler le départ de croissances fongiques ou bactériennes pour ainsi ralentir le pourrissement post-récolte (tableau x). Il peut être utilisé en prétraitement avant stockage, en stockage en atmosphère modifiée en continue (ou par intermittence). Les effets de l'ozone sur les microorganismes sont dépendants de leur espèce, des produits et des conditions de stockage (température, humidité,...) (Pascual *et al.*, 2007). A de fortes concentrations (de l'ordre du ppm), le stockage prolongé sur plusieurs jours peut entraîner des lésions tissulaires au niveau du végétal (Forney *et al.*, 2003).

En plus de ses effets sur les microorganismes, des études ont montrés que l'ozone permettait la réduction de l'éthylène dans l'atmosphère provoquant l'augmentation du temps de maturation des pommes et poires (Skog, 2001). Par ailleurs, une exposition prolongée de 12 jours à des concentrations modérées en ozone (0,3 ppm) n'induit pas d'effet sur les anthocyanes (polyphénols) de la mûre et provoque une baisse de l'activité des peroxydases (Barth *et al.*, 1995) (Tableau V).

Tableau V : effet de l'ozone sur le stockage des pommes et des poires.

Produit alimentaire	Condition du stockage	Paramètres étudiés	Références
Pomme	0,4 à 4 ppm d'O ₃ gazeux en continue et en intermittence	Elimination d'odeur, délai de maturation, comptage spores et germination,	(Smock and Watson, 1941)
	1,95 ppm gazeux – 1 à 2 h / jour – 5 mois	Pourrissement, comptage spores fongiques, dommages produits, contrôle de surface (stockage)	(Schomer and McColloch, 1948)
	2 à 10 cm ³ d'O ₃ gazeux / m ³ pendant plusieurs heures	durée de vie du fruit	(Kuprianoff, 1953)
	0,006 ppm d'O ₃ gazeux – 4h / jour	Dégradations, perte de poids	(Bazarova, 1982)
	25 mg / L d'O ₃ dissous – 4, 22 et 45 °C – 1, 3 et 5 min de traitement	Croissance d' <i>E. coli</i> O157:H7 – <i>Challenge test</i>	(Achen and Yousef, 2001)
	3 ppm d'O ₃ dissous 5 min	Inhibition d' <i>E. coli</i> O157:H7 et <i>L. monocytogenes</i> , analyse de la flore de dégradation, analyse sensorielle	(Rodgers <i>et al.</i> , 2004)
Poire		Incidence et gravité de <i>P. expansum</i> , germination des spores de <i>B. cinerea</i> , <i>M. piriformis</i> et <i>P. expansum</i> , concentration fongique dans les eaux de lavage, maturation des poires pendant stockage	(Spotts and Cervantes, 1992)
	0,4 µL / L O ₃ gazeux en chambre de stockage	Production d'éthylène, paramètres physico-chimiques	(Skog, 2001)

3.3. Lumière pulsée

La lumière pulsée est caractérisée par des flashes lumineux produits par une lampe à arc au xénon. Les longueurs d'ondes du spectre s'étalent des 200 à 1300 nm, des ultraviolets aux infra rouges (Levy, 2010). La durée des traitements est relativement courte. Il consiste à irradier plusieurs fois le produit par des flashes d'une durée comprise entre la microseconde et la milliseconde. Ces flashes sont obtenus par l'énergie accumulée dans des condensateurs qui se déchargent instantanément dans la lampe (plusieurs centaines d'ampères). Les atomes de xénon sont alors excités et ionisés lors du passage du courant. Leur retour à l'état fondamental se fait par l'émission de photons (Hiramoto, 1984). Les doses reçues par le produit à traiter sont généralement exprimées par la fluence dont l'unité est le joule par centimètre carré (J / cm^2) ; c'est l'énergie reçue par unité de surface. Elle dépend :

- Du nombre de flashes
- De la tension appliquée
- Du positionnement de l'échantillon

Deux mécanismes d'inactivation des microorganismes ont été mis en évidence : (1) l'action des longueurs d'ondes UV et (2) l'action photothermique induit par le spectre entier.

- (1) Les mécanismes d'action des UV émis par la lumière pulsée sont les mêmes que ceux émis par les UV (Gayan *et al.*, 2013). Ceux-ci ont deux modes d'action ; les UVA (de 320 nm à 400 nm) attaquent indirectement l'ADN en induisant la formation de radicaux libres. Les UVB et C (200 à 320 nm) quant à eux créent des lésions et mutations sur les molécules d'ADN pouvant être létales, notamment des dimères de thymine (Gomez-Lopez *et al.*, 2007).
- (2) L'action photothermique induirait la rupture membranaire du microorganisme par une brève et intense élévation de la température au niveau du microorganisme (Wekhof, 2000) (fluence supérieure à $0,5 \text{ J} / \text{cm}^2$). Des spores d'*Aspergillus niger* traités à la lumière pulsée présentent (au microscope) de grandes déformations (Wekhof *et al.*, 2001).

Ces modes d'actions sont encore à l'étude et l'efficacité du traitement serait variable selon le microorganisme et la fluence (Wuytack *et al.*, 2003). Les spores de moisissures semblent plus résistantes que les bactéries. Les bactéries à GRAM (+) sont moins sensibles que les bactéries à GRAM (-) (Gomez-Lopez *et al.*, 2005; Rowan *et al.*, 1999).

Dans la littérature, la fluence est définie pour caractériser les traitements à la lumière pulsée. Cependant, il est difficile d'avoir des informations systématiques sur la résistance microbienne, car même si les traitements sont caractérisés par la fluence, de nombreux paramètres régissent l'efficacité comme la tension, le type de lampe, ses réflecteurs... L'épaisseur et le type de la matrice dans laquelle est incluse le microorganisme influencent directement la pénétration des rayons (Krishnamurthy *et al.*, 2004) et donc l'efficacité du traitement. La rugosité notamment entraîne des phénomènes d'écrans (ou de zones d'ombre). Dans certains cas, la lumière pulsée peut modifier la couleur du produit comme pour l'assainissement du poivre noir (Fine and Gervais, 2004). Pour les

liquides, les traitements ne pourront être réalisés que sur des produits peu colorés et sur de faibles épaisseurs.

Généralement, les traitements à la lumière pulsée sont adaptés à la désinfection de surface. Une connaissance tomographique de la matrice à traiter est donc recommandée. Le traitement des fruits, des légumes et d'autres végétaux par ce procédé est donc réalisable, tout en étant conscient des altérations physico-chimiques qu'il peut induire (Gomez-Lopez *et al.*, 2007, 2005).

3.4. Synthèse des traitements assainissants

Le Tableau VI résume des techniques assainissantes utilisées en IAA.

II. Etude bibliographique

1 Tableau VI : technologies assainissantes retrouvées en IAA

Technique	Principe	Mode d'action	Avantage	Inconvénient	Références
Pasteurisation vapeur et eau	Traitement réalisé par l'utilisation d'un fluide (eau ou vapeur d'eau) qui transporte l'énergie thermique	Assainissement des microorganismes par effet thermique et physique	<ul style="list-style-type: none"> - Facile à mettre en place - Faible coût car température modérée - Effet assainissant mécanique (ruissellement) et physique (température) 	<ul style="list-style-type: none"> - Altération possible du produit par phénomène de cuisson (perte fermeté, brunissement...) 	(Bischof <i>et al.</i> , 1995; Juneja <i>et al.</i> , 2002; Lurie, 1998; Maxin, 2012; Maxin <i>et al.</i> , 2012a; Schirra <i>et al.</i> , 2000)
Ozone	Traitement gazeux ou à l'ozone dissous dans l'eau	Oxydation puissante de la matière organique (microorganismes)	<ul style="list-style-type: none"> - Plus puissant que les produits chlorés - Actif sur tous les microorganismes - Facilité de production - Non rémanent dans le produit (décomposition naturel en O₂ et H₂O) - Coût modéré (selon mode de production : Décharge Corona) - Dégradation de molécules comme pesticides et toxines 	<ul style="list-style-type: none"> - Oxydation aspécifique : dégradation du produit possible si traitement trop rigoureux - Synthèse possible de produits néoformés d'origines diverses (pesticides, toxines, bromates) - Coût élevé (selon mode de production : UV) 	(Gil <i>et al.</i> , 2009; Guzel-Seydim <i>et al.</i> , 2004; Najafi and Khodaparast, 2009; O'Donnell <i>et al.</i> , 2012; J. G. Wu <i>et al.</i> , 2007)
Lumière pulsée	Irradiation du produit par des flashs lumineux (λ de 20 nm à 1300 nm) de fortes intensités	Altération de l'ADN (UV) et ruptures membranaires due à une hausse localisée de température	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidité de traitement - Conservation des propriétés organoleptique et nutritionnelles du produit 	<ul style="list-style-type: none"> - Perte de couleur dans certains cas - Sujet aux phénomènes d'écran - Efficacité limitée aux surfaces 	(Fine and Gervais, 2004; Gayan <i>et al.</i> , 2013; Gomez-Lopez <i>et al.</i> , 2007, 2005; Hiramoto, 1984; Krishnamurthy <i>et al.</i> , 2004; Levy, 2010; Wekhof, 2000; Wekhof <i>et al.</i> , 2001; Wuytack <i>et al.</i> , 2003)

II. Etude bibliographique

Champs électriques pulsés	Application d'un champ électrique de fortes intensités (millier de volts) au sein d'un liquide conducteur (matrice)	Création d'une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule → création de pores irréversibles dans les membranes	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement en continue des liquides possibles - Conservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Uniquement applicable aux produits pompables - Encrassement des électrodes (diminution rendement) 	(Barsotti and Cheftel, 1999; Cserhalmi <i>et al.</i> , 2006; Góngora-Nieto <i>et al.</i> , 2002; Grahl and Märkl, 1996; Heinz <i>et al.</i> , 2001; Hu <i>et al.</i> , 2005; Kolb <i>et al.</i> , 2006; Levy, 2010; Qin <i>et al.</i> , 1996; Sale and Hamilton, 1967; Wu <i>et al.</i> , 2005; Zhang <i>et al.</i> , 1995)
Hautes pression	Application d'une très haute pression (1000 à 8000 bars)	Altérations de l'expression des gènes et de la traduction protéique, altérations physiques des organelles et des membranes	<ul style="list-style-type: none"> - Conservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques - Couplage possible avec d'autres technologies (injection dioxyde de carbone) 	<ul style="list-style-type: none"> - Traitement en batch - Equipement coûteux - Utilisable uniquement sur les produits « flexibles » car déformation temporaire durant traitement 	(Bartlett, 2010; Buzrul <i>et al.</i> , 2008; Devlieghere <i>et al.</i> , 2004; Garcia-Gonzalez <i>et al.</i> , 2007; Goodridge <i>et al.</i> , 2006; Huang <i>et al.</i> , 2006; Meyer <i>et al.</i> , 2000; a <i>et al.</i> , 1999; Wimalaratne and Farid, 2008)
Ionisation	Bombardement du produit par rayonnement électromagnétique de hautes énergies (Gamma, X et flux d'électron)	Modifications létales des acides nucléiques, création de radicaux libres au sein de la cellule	<ul style="list-style-type: none"> - Pouvoir de pénétration important pour les rayons de haute énergie → traitement de produit volumineux - Traitement possible une fois le produit conditionné - Maintien des propriétés nutritionnelles 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de sources radioactives - Obligation législative d'informer le consommateur - Altération organoleptique 	(Farkas <i>et al.</i> , 2007; Mafard, 1997; Mittendorfer <i>et al.</i> , 2002; Nicholson <i>et al.</i> , 2000; Setlow, 2006; Zhao <i>et al.</i> , 1996)

4. Techniques d'évaluation et de caractérisation des populations microbiennes

D'un point de vue microbiologique, on distingue deux aspects pour les produits alimentaires :

- l'Aspect sanitaire : risque pour le consommateur de tomber malade suite à l'absorption de microorganismes pathogènes
- l'aspect hygiénique : dégradation des produits (odeur, couleur...) par des microorganismes sans pour autant introduire un risque pour le consommateur

L'industriel est seul responsable de la qualité de ses produits. Il doit fournir des produits sains d'un point de vue sanitaire pour le consommateur. Pour ce faire, il existe plusieurs stratégies. Dans un premier temps, l'industriel doit mettre son process « sous contrôle », c'est-à-dire en appliquant les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication. Dans un second temps, il mettra en place l'HACCP qui permettra en cas d'accident microbiologique d'en trouver la cause et de faire une action corrective ciblée dans le process, le plus rapidement possible.

Pour évaluer les dangers microbiens, il existe différentes méthodes faisant appel parfois à plusieurs protocoles pour un même microorganisme. Chaque protocole ayant ses avantages et inconvénients, il convient de choisir celui le plus adapté en fonction des stratégies microbiologiques adoptées. On peut distinguer deux classes de protocoles ; ceux visant à quantifier des populations microbiennes et ceux visant à mettre en évidence la présence ou non d'un microorganisme. Cette dernière démarche est appelée communément « technique de recherche de microorganisme ». Elle est souvent utilisée en alimentaire pour détecter de faibles concentrations de micro-organismes non détectables par les techniques de dénombrement. Cependant, une faible concentration est suffisante pour rendre le produit impropre à la consommation d'un point de vue sanitaire. Ces techniques de recherche passent par des étapes d'enrichissements sur milieux sélectifs graduels et d'identification de ces micro-organismes. Dans notre étude, nous n'avons pas fait appel à ce genre de technique. En effet, notre focus est de mesurer l'efficacité de traitements assainissants. Nous développerons donc ici les méthodes de dénombrement, méthodes qui permettent d'évaluer les traitements assainissants sur les diminutions des populations microbiennes. Cependant plusieurs techniques de quantification sont à la disposition du microbiologiste. Nous présenterons ci-après les avantages et les inconvénients de chacune qui ont déterminé nos choix dans notre étude.

4.1. Dénombrement par utilisation d'un milieu solide

La méthode de dénombrement la plus connue est la méthode de dénombrement par utilisation d'un milieu solide (ISO 7218:2007/Amd 1:2013, 2013). Le principe est de déposer dans un milieu, des dilutions liquides d'un échantillon. Les cellules ainsi « fixées » vont se multiplier de proche en proche pour donner des structures macroscopiques visibles à l'œil nu ou par outils de mesure par analyse d'image : les colonies.

Le principal avantage de cette technique est qu'elle est très facile à mettre en place et peu coûteuse. De plus, les colonies peuvent être isolées pour identification phénotypique. Une variante existe pour les microorganismes ayant tendance à s'étaler sur la gélose : la méthode double couche.

Lors du comptage des colonies, les incertitudes sont d'autant plus importantes que leur nombre est faible (cf. Annexe I : Tableau XLV : table des intervalles de confiance pour le dénombrement des petits nombres). Afin d'augmenter le seuil de détection et de diminuer l'incertitude pour les petits nombres (= petites concentrations en microorganismes), la méthode d'ensemencement en profondeur est utilisée avec une augmentation de la quantité d'inoculum.

La technique d'ensemencement sur gélose, hormis son rôle pour la quantification, peut être utilisée pour la sélection de populations restreintes de microorganismes (milieux sélectifs et identification phénotypique). Bien que l'utilisation de milieux de culture sélectifs et électifs soit controversée (Nichols, 2007; Ritz, 2007), ils sont toujours utilisés pour le dénombrement de populations spécifiques dans des contextes écologiques donnés. Une amélioration vers la sélection d'espèces a été apportée par des milieux avec analogues de substrats

La méthode d'identification des espèces en microbiologie « classique » repose principalement sur l'étude macroscopique de souches pures isolées sur milieux solides tout d'abord (phénotype des colonies) puis microscopique (phénotype au microscope). Elle peut ensuite être couplée à des méthodes biochimiques (galeries API...) et d'autres tests basés sur l'activité des microorganismes. Aujourd'hui, les techniques moléculaires permettant l'identification plus fines des espèces de microorganismes (partie développer en II.F.b. Marqueurs moléculaires).

Les méthodes d'analyse cultures-dépendantes, ont leurs limites. Dans les années 80, (Roszak *et al.*, 1987; Staley and Konopka, 1985) annoncent que dans un échantillons donnés, 85 à 99,999 % des espèces ne seraient pas cultivables avec les techniques classiques. Les causes de ces résultats pourraient être notamment les compositions de milieux de culture pouvant ne pas convenir, par manques de molécules indispensables, par la présence de substances inhibitrices, de propriétés physico-chimiques et / ou des phénomènes de compétition d'occupation de l'espace... (Amann *et al.*, 1995). Pour essayer de pallier à ces problèmes, de nombreux milieux commerciaux ont été mis au point afin de cibler au maximum certaines populations microbiennes.

L'existence de milieux contenant des analogues de substrats (chromogènes, fluorogènes,...) permettant le plus souvent une différenciation des colonies selon un phénotype particulier (activité enzymatique, relargage de molécules,...) et de les identifier.

Si cette méthode est très économique en matériel, elle en est néanmoins fastidieuse. Elle nécessite beaucoup d'opérations manuelles, longues et sources d'erreurs. Elles sont donc peu appropriées pour les situations qui nécessitent beaucoup de dénombrement (moyennes sur des échantillons). De plus, le délai de réponse est souvent long. Des variantes alternatives de ces méthodes classiques ont donc été développées depuis quelques années. Ces variantes concernent souvent des améliorations d'étapes classiques. C'est notamment le cas des ensemenceurs Spiral qui permettent le dépôt rapide des échantillons sur gélose. Nous verrons plus loin, que des techniques alternatives basées sur d'autres principes ont également été développées.

Pour certaines applications, les méthodes de dénombrement sur gélose ne possèdent pas un seuil de détection assez bas. Pour cela, les méthodes de dénombrements en milieu liquide sont utilisées. Elles sont basées sur le principe du nombre le plus probable (NPP).

4.2. Dénombrement par utilisation d'un milieu liquide : Technique du nombre le plus probable (NPP)

La technique du nombre le plus probable permet d'estimer le nombre de microorganismes en se basant sur un ensemencement en milieu liquide dans des séries de tubes en effectuant des dilutions (Sutton, 2010). Le principe est basé sur la probabilité de prélever dans un volume donné d'aliment (ou d'une de ses dilutions) des microorganismes capables de donner un signal positif une fois réensemencés dans un milieu de culture. Pour une analyse, plusieurs dilutions successives sont réalisées. Chaque tube contient un indicateur coloré qui en présence de croissance de microorganismes évolue, entraînant une modification de couleur du milieu. Le tube est considéré comme positif (+) s'il y a changement de couleur du milieu et négatif (-) si celle-ci ne change pas. Selon la précision souhaitée, le nombre de tubes ensemencés est plus ou moins élevé (NF ISO 7218 : 2007). En général, la technique mise en œuvre demande trois tubes par dilution. Les résultats (nombre de tubes + ou -) sont ensuite reportés dans une table de Macgrady (Annexe I : Tableau XLVI : table de Macgrady à 3 entrées avec 3 tubes par série). Les résultats donnés par cette table représentent une estimation du nombre de microorganismes de la solution analysée.

Comme pour la méthode en milieu gélosé, il existe des intervalles de confiances en rapport avec les résultats obtenus dans les séries de tube. En augmentant le nombre de tubes par dilution, ces intervalles de confiance deviennent alors plus fins (Blodgett, 2006).

La méthode des NPP est utilisée par rapport à la méthode sur gélose dans le cas de faibles concentrations en microorganismes. Son seuil de détection est en effet plus bas. Elle est également préférée pour l'estimation du nombre de microorganismes dans les cas où il y a présence de particules ou turbidité dans la matrice, en général dans les aliments mais aussi les eaux résiduaires et les sols. Elle n'est cependant pas très utilisée dans le cas de dénombrement fongique. Elle est utilisée dans de nombreux domaines comme l'agroalimentaire, la pharmacologie, l'eau, l'environnement, l'agriculture,... Des méthodes alternatives à la méthode des NPP ont été mises au point avec l'utilisation de microplaques, de méthodes automatiques ou par PCR (Carvalho *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 2005; Saitoh *et al.*, 2002), mais la plus grande innovation dans ce secteur a été la création du Tempo® de chez Biomérieux.

En 2005, la société Biomérieux commercialise le système Tempo®. C'est le premier système automatisé conçu spécifiquement pour les applications en agroalimentaire. Son principe est basé sur la méthode des NPP miniaturisée avec révélation par fluorescence.

Les analyses sont réalisées à l'aide de carte (Figure 10) en association avec un flacon. La particularité de cette méthode n'est pas de réaliser des dilutions de concentration comme pour le NPP classique mais des dilutions volumiques. C'est une miniaturisation de la méthode NPP avec 16 tubes par série

de dilution (tubes miniaturisés ; cf. Figure 10). Le nombre étant élevé, les incertitudes sont plus faibles (Annexe I : Tableau XLVII).

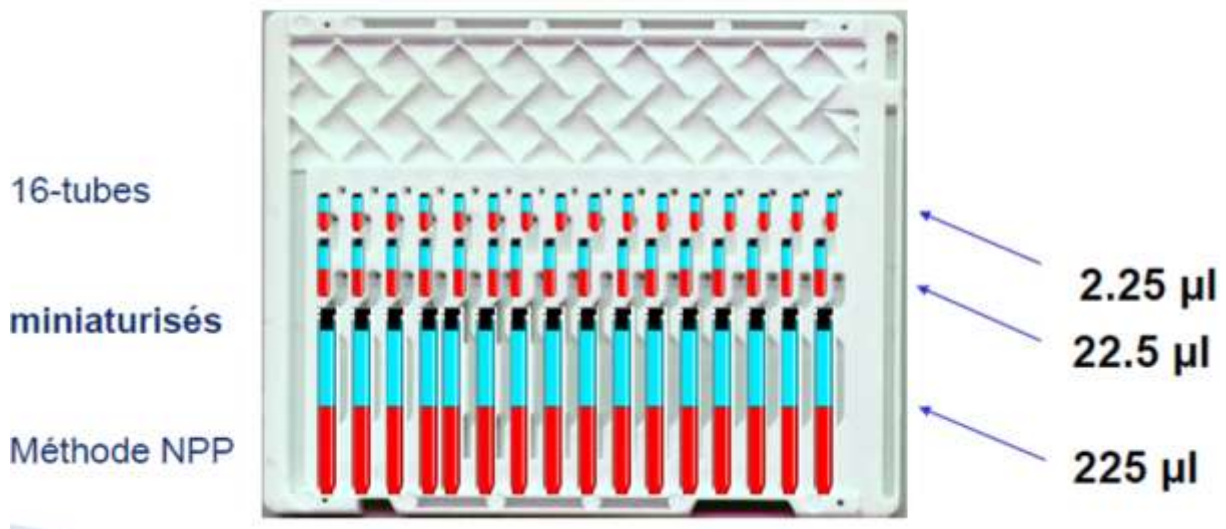


Figure 10 : schéma d'une carte Tempo®

Biomérieux propose actuellement 10 cartes différentes selon les flores étudiées : Flore Mésophile aérobie, levures / moisissures, coliformes, bactéries lactiques,... Toutes ces cartes sont validées par des organismes internationaux certificateurs tels que ISO 16140 / AFNOR et AOAC.

La méthode Tempo® permet de traiter un grand nombre d'échantillon par un seul opérateur grâce à son automatisation (500 analyses par jour). Son temps de réponse est court par rapport aux méthodes sur boîte et NPP classique. Principalement destiné aux laboratoires d'analyses microbiologiques, il peut tout à fait être utilisé dans le cadre de la recherche à condition de valider son utilisation dans le contexte particulier (Torlak *et al.*, 2008; Zitz *et al.*, 2011). En IAA, il est particulièrement bien adapté à la démarche HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*). En effet, sa rapidité et son haut débit permet d'avoir des réponses fiables afin de libérer les lots produits dans les meilleurs délais.

4.3. Synthèses des techniques de dénombrement existantes

D'autres techniques de dénombrement sont disponibles pour l'analyse des aliments. Le Tableau VII présente une liste non exhaustive.

II. Etude bibliographique

Tableau VII : techniques de dénombrement disponibles pour des analyses agroalimentaires

Technique	Principe	Avantage	Inconvénient	Références
Culture-dépendante	Méthode gélosée	Etalement sur gélose et dénombrement des colonies macroscopiques - Facile à mettre en place - Récupération des colonies pour étude ultérieure	- Fastidieuse car étapes longues - Sources d'erreurs car beaucoup d'étapes - Seuil de détection faible	(ISO 7218:2007/Amd 1:2013, 2013)
	Méthode NPP classique	Ensemencement de séries de tubes sur plusieurs dilutions. Révélation indirecte par colorant ou activité métabolique (synthèse de gaz...) - Peu coûteuse - Seuil de détection plus faible que sur milieu solide	- Très fastidieuse - Nombre de tubes élevé pour augmenter la fiabilité	(Blodgett, 2006; ISO 7218:2007/Amd 1:2013, 2013)
	Méthode Tempo®	Ensemencement de cartes → miniaturisation de la méthode NPP classique - Rapidité car semi-automatique (ensemencement + comptage) 500 échantillons par jour - Diminution des temps de culture (résultat en 24h pour certaines flores) - Meilleure sensibilité de détection - Fiabilité car 16 puits par dilution	- Peut être soumise à des effets de matrice (méthode fluorimétrique) - Consommables coûteux si faible utilisation - Filtration systématique des échantillons (microfluidique)	(Torlak <i>et al.</i> , 2008; Zitz <i>et al.</i> , 2011)

II. Etude bibliographique

Culture- indépendante	Impédancemétrie	Mesure de la variation de conductivité du milieu de culture induite par le métabolisme microbien	<ul style="list-style-type: none"> - Rapidité des résultats (5 h dans le cas de matrice chargée) - Lecture des résultats rapides 	<ul style="list-style-type: none"> - Peu adaptée aux microorganismes ne sécrétant pas de métabolites ionisés (levures...) - Interprétation des résultats parfois difficile 	(Caubet <i>et al.</i> , 2008; Connolly <i>et al.</i> , 1994; Dezenclous <i>et al.</i> , 1994)
	Microscopie	Comptage direct des cellules au microscope, ou après développement sur membrane	<ul style="list-style-type: none"> - Résultats quasi-instantanés - Peu coûteuse en matériel et consommable 	<ul style="list-style-type: none"> - Fastidieuse dans le cas d'échantillonnage élevé 	(Kirchman <i>et al.</i> , 1982; Seo <i>et al.</i> , 2010)
	Cytométrie de flux	Comptage optique de cellules marquées	<ul style="list-style-type: none"> - Résultat rapide - Spécificité possible avec technique biochimique ou moléculaire (FISH) - Différenciation des viables et non viables 	<ul style="list-style-type: none"> - Microfluidique : obstruction des capillaires - Faux positifs possibles (particules ou bulles d'air) - Peu fiable pour les produits faiblement contaminés 	(Kerstens <i>et al.</i> , 2013; Khan <i>et al.</i> , 2010; Mezule and Los, 2015; Wilkes <i>et al.</i> , 2012)
	PCR en temps réels	Déduction du nombre de cellules par amplification du matériel génétique	<ul style="list-style-type: none"> - Degré de spécificité très élevée (espèce voir souche) - Dénombrement des espèces non cultivable - Résultat rapide pour les méthodes de routine 	<ul style="list-style-type: none"> - Mises au point nécessaires - Difficulté d'amplification pour les ADN riches en GC - Connaissance obligatoire des espèces étudiées 	(Carasi <i>et al.</i> , 2015a; Diguta <i>et al.</i> , 2010; Higuchi <i>et al.</i> , 1993; Neeley <i>et al.</i> , 2005; Zott <i>et al.</i> , 2010)

4.4. PCR en temps réel (PCR quantitative)

Le principe de la PCR (*polymerase chain reaction*) en temps réel repose sur la détection et la quantification d'une source de fluorescence révélée au cours des cycles d'amplification. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplifiats formés (Higuchi *et al.*, 1993). Le nom de cette méthode vient du fait qu'il est possible de suivre lors de la PCR l'évolution de l'amplification.

Les principes sont les mêmes que pour la PCR classique. L'amplification est décomposée en trois phases :

- Phase d'initiation : il n'y a pas de détection de fluorescence, elle correspond au bruit de fond. Elle se termine lorsque la fluorescence du milieu réactionnel dépasse la valeur seuil de la méthode. L'évolution de la fluorescence ensuite suit une loi exponentielle
- Phase exponentielle : le cycle où la multiplication devient exponentielle correspond à la valeur Ct (*Cycle Threshold*). Il existe une corrélation entre le nombre de séquence cible de départ et le Ct obtenu, cette linéarité étant la base de la quantification (Gibson *et al.*, 1996).
- Phase de plateau : les réactifs présents dans le milieu réactionnel deviennent limitant.

La valeur du Ct peut-être reliée à un nombre d'UFC car la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN de départ. Pour cela, il est nécessaire de réaliser une gamme étalon avec du matériel génétique de concentration connue, si possible extrait dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser (Pfaffl, 2001). Si pour le dénombrement de cultures pures, cette méthode fonctionne bien, il est possible que dans des matrices complexes, des biais puissent apparaître.

Il existe d'abord les biais de sélection et les biais de dérive (Wagner *et al.*, 1994). Les biais de sélection sont dus à des affinités différentes des amorces pour l'ADN cible, induites par la structure primaire ou secondaire. C'est notamment le cas lors de l'étude d'ADN cible riche en GC qui peuvent conférer des structures difficiles à dénaturer et à amplifier (Dutton *et al.*, 1993). Dans le cas d'utilisation d'amorces « universelles », il est également possible de rencontrer des problèmes de mésappariements entre les amorces et la région cible, des mutations ayant pu intervenir lors de l'évolution d'une espèce vers une autre (cf. II.5.2. Marqueurs moléculaires). Les biais de dérive sont le résultat d'événements aléatoires pouvant intervenir dans les premiers cycles de PCR (appariement des amorces avec des séquences partiellement spécifiques...). Ces biais ne sont pas répétables et interviennent d'autant plus que la quantité de matériel génétique cible est faible initialement.

La détection des amplifiats peut se faire selon 2 méthodes : soit par l'utilisation de sonde marquée par un fluorophore, soit en utilisant un intercalant de l'ADN fluorescent.

4.4.1. SYBR Green

La méthode au SYBR Green utilise un fluorophore non spécifique qui s'intercale au sein de l'ADN double brins (Bustin, 2005). De ce fait, la totalité de l'ADN présent dans le milieu réactionnel est fluorescent. Les étapes sont les mêmes qu'une PCR classique (Figure 11). Pendant le cycle, au cours de l'élongation, le SYBR Green vient s'intercaler entre les bases fraîchement appariées (2). Cette molécule devient alors fluorescente quand elle est excitée. La fluorescence totale du milieu réactionnel augmente donc avec le temps (3). Contrairement à la méthode Taqman® (voir plus loin),

il n'y qu'un degré de spécificité, celui des amorces. Il est primordial d'optimiser ces amorces et les conditions de PCR pour prévenir des contaminations génomiques et ne pas avoir de faux positifs. Pour savoir s'il existe plusieurs amplifiats possédant des G+C % différents, il est possible de réaliser une courbe de fusion à la fin des cycles d'amplification. Si l'échantillon présente plusieurs pics, cela signifie que plusieurs amplifiats différents sont présents dans le milieu réactionnel, appartenant potentiellement à des espèces différentes.

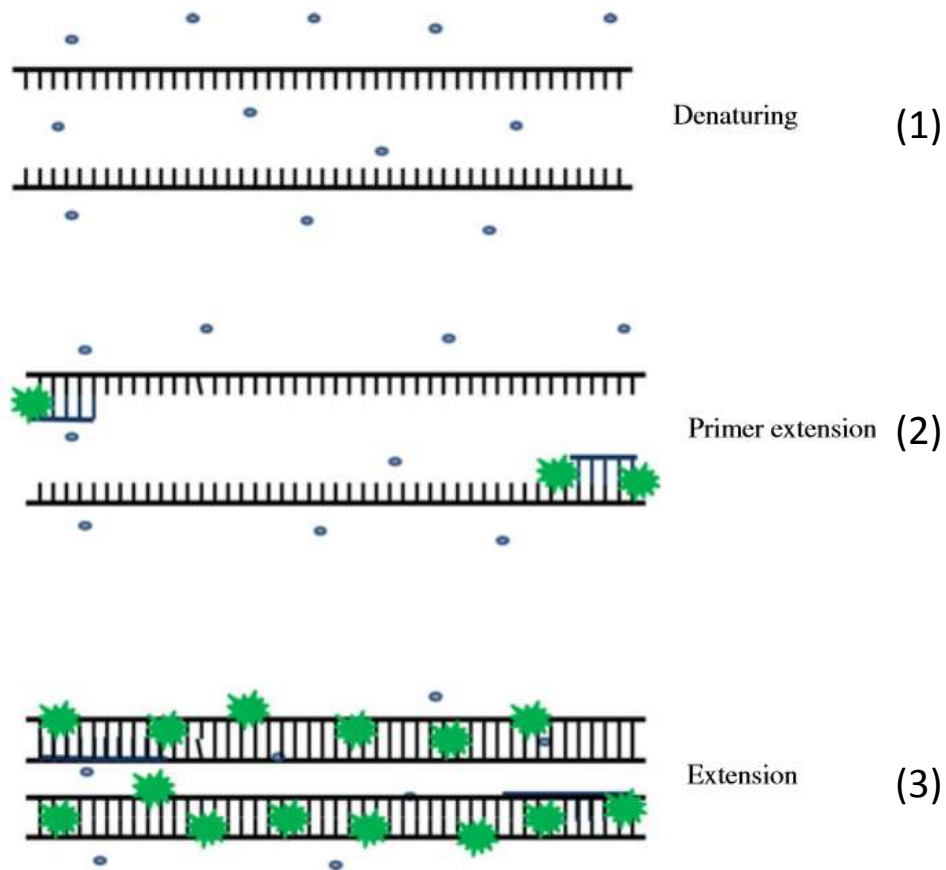


Figure 11 : représentation schématique de la méthode de détection par SYBR® Green. [(Botes *et al.*, 2013)

Cette méthode de biologie moléculaire est utilisée comme outil de détection et de quantification de microorganismes tels que les bactéries lactiques (Neeley *et al.*, 2005), en œnologie (Diguta *et al.*, 2010; Zott *et al.*, 2010), le microbiote intestinal (Carasi *et al.*, 2015a)...

4.4.2. Méthode Taqman®

La méthode Taqman® est basée sur une sonde nucléotidique d'une 15^{aines} de paires de bases dessinée pour s'hybrider avec l'amplifiat de PCR. Elle possède à ses extrémités 5' un fluorophore et 3' un *Quencher*. Ce dernier a pour rôle d'absorber la fluorescence du fluorophore lorsqu'ils sont tous les deux fixés sur la sonde. Durant les cycles de PCR (Figure 12), la sonde vient se fixer sur l'ADN cible (1). Lors de la polymérisation (2), l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase détruit les bases

constituant la sonde (3) libérant ainsi le fluorophore dans le milieu réactionnel (Holland *et al.*, 1991). De ce fait, la fluorescence est spécifiquement proportionnelle à la quantité d'amplifié. La lecture de fluorescence se fait après chaque cycle d'élongation. Ainsi, cette méthode possède deux degrés de spécificité : le premier grâce à la spécificité des amorces de PCR, le second vient de la spécificité de la sonde.

Un des avantages de la PCR avec la méthode Taqman®, même si les coûts sont plus élevés que la méthode au SYBR Green, est qu'il est possible de réaliser des PCR multiplex. Selon l'appareil, il est possible de réaliser de 2 à 5 réactions dans le même puits et en même temps en utilisant des fluorophores différents. En revanche, il n'est pas possible de réaliser en fin de PCR la courbe de fusion permettant éventuellement de connaître le nombre de molécules différentes amplifiées.

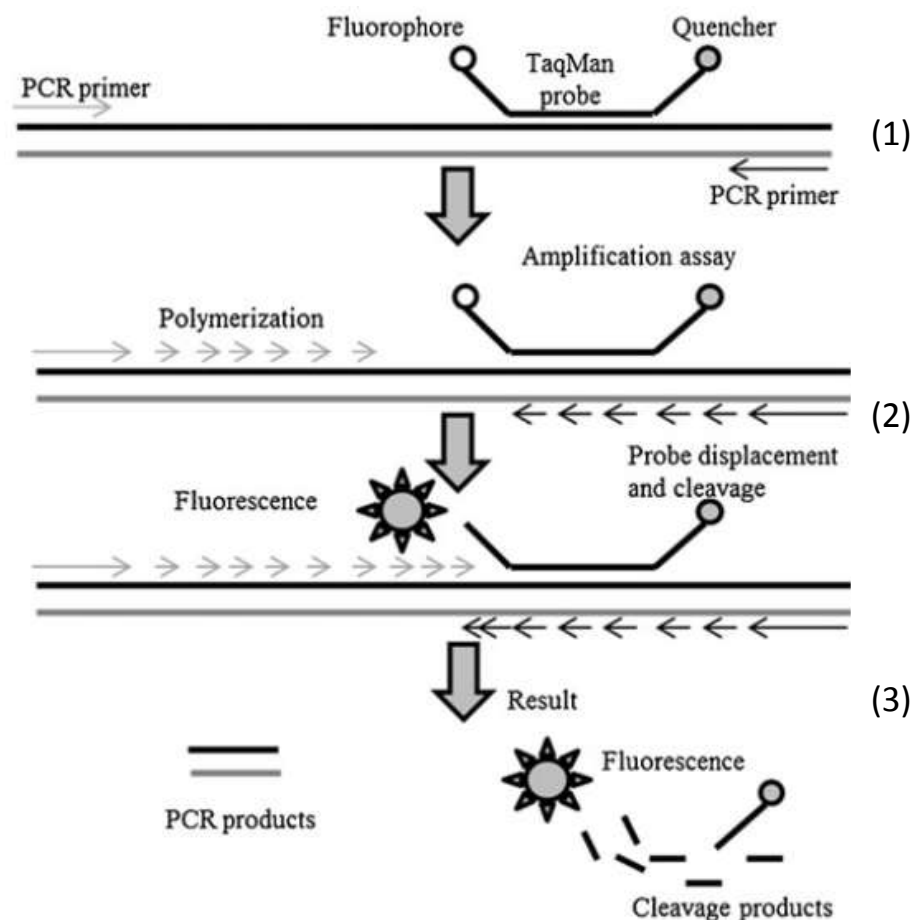


Figure 12 : représentation schématique de la méthode de détection par sonde Taqman®. D'après (Botes *et al.*, 2013)

Ces dernières décennies, de nombreuses techniques toujours plus innovantes ont fait leur apparition dans le domaine du dénombrement et de la détection de microorganismes, pathogène de l'Homme ou non. Ces méthodes ont pour intérêt d'être soit plus simple, soit plus rapide voire en temps réel, plus spécifique,... Ces techniques mettent en avant les dernières avancées technologiques et les nouvelles connaissances acquises sur les bactéries et champignons dans les domaines de la biochimie et de la biologie moléculaire.

5. Profilage génétique

5.1. Ecologie microbienne

Les progrès réalisés dans les années 90 avec l'arrivée de la PCR ainsi que l'arrivée du séquençage de l'ADN haut débit (Metzker, 2010) ont permis l'avènement de l'ère de la biologie moléculaire. Les découvertes dans ce domaine ne cessent d'évoluer, ouvrant chaque jour de nouveaux champs d'investigation. La connaissance des génomes, en parallèle des avancées informatiques, a permis de créer des bases de données importantes. Le NCBI (*National Center for Biotechnology*) (NCBI, 2015a) référence 68161 séquences complètes d'organismes de procaryotes (47675), d'eucaryotes (2424), de virus (4875), de plasmides (6141) et d'organelles (7046) ainsi que plus de 12 millions de gènes. Toutes ces connaissances ont permis d'aborder la microbiologie d'un autre point de vue. D'abord, par des approches dites méta-génomiques pour l'étude des populations d'un biotope où le séquençage direct du génome permet de s'affranchir de toutes les étapes fastidieuses de clonage et / ou d'amplification (Ventosa *et al.*, 2015). Ensuite par l'analyse de gènes d'intérêt, soit des gènes dit fonctionnels qui ont un rôle dans un écosystème particulier (*nifH*, *nirS*, *rpoB*,...) (Dahllöf *et al.*, 2000), soit les gènes codant pour les ARN ribosomiques utilisés le plus souvent pour la taxonomie (Torsvik and Øvreås, 2002).

Si les écosystèmes bactériens sont relativement bien étudiés (Ley *et al.*, 2006; Sorokulova *et al.*, 2003; Torsvik and Øvreås, 2002; Ventosa *et al.*, 2015), la diversité et les fonctions des levures au sein d'un écosystème le sont un peu moins (Cocolin *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Möhlenhoff *et al.*, 2001).

5.2. Marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires pour l'étude des écosystèmes microbiens n'ont cessé d'être utilisés et améliorés au cours de ces vingt dernières années. Ils sont souvent basés sur la taxonomie phylogénétique, en particulier, pour l'identification microbienne. Ces marqueurs correspondent le plus souvent aux ARN ribosomiques. Comme il possède une « horloge moléculaire » lente, il évolue moins vite que le reste du génome. Ces marqueurs évolutifs robustes permettent de décrire la phylogénie des populations microbiennes.

Les ADN ribosomiques (ADNr) sont des gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) qui sont partis intégrantes des ribosomes. Les ARNr sont présents chez tous les organismes vivants ; on les retrouve dans les cellules eucaryotes (ARNr 28 S, 26 S, 18 S, 5.8 S et 5 S) et chez les procaryotes (ARNr 23 S, 16 S et 5 S) (Figure 13). Les eucaryotes possèdent plusieurs copies en tandem des ADNr sur un ou plusieurs chromosomes. Ces gènes sont séparés par des régions de 2 types ; les ITS (*Internal Transcribed Spacer*) et les IGS (*InterGenetic transcribed spacer*).

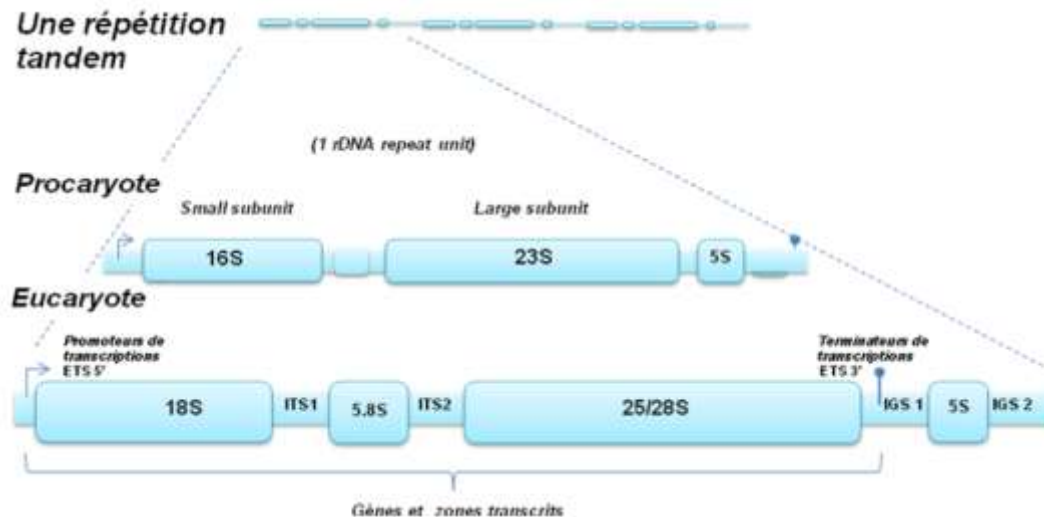


Figure 13 : représentation schématique des gènes codant pour les ARN ribosomiques (d'après (Marques Martins, 2012))

L'omniprésence des ADNr chez toutes les espèces vivantes en a fait des marqueurs moléculaires de choix pour l'étude taxonomique et de métagénomique (Anderson and Cairney, 2004; Khot *et al.*, 2009; Kurtzman and Robnett, 1998; Massias, 2008). Leur structure est en effet bien conservée dans le temps. La séquence les caractérisant est composée d'une alternance de domaines dont les vitesses d'évolution sont variables (Adachi *et al.*, 1996; Gutell *et al.*, 1994). Ainsi, pour comparer des espèces très proches entre elles, voire des souches (Amann *et al.*, 1995), les domaines les plus variables sont étudiés alors que si ce sont des espèces plutôt éloignées, l'étude se fera dans les régions les mieux conservées.

Cependant, les gènes de l'ADNr sont sous forme d'opéron avec plusieurs copies identiques par cellule (Hillis and Dixon, 1991) et il est possible, dans certains cas, que ces copies diffèrent entre elles pour un même organisme (Clayton *et al.*, 1995; Sipiczki *et al.*, 2013). Ceci peut alors biaiser les résultats en surestimant le nombre d'espèces détectées dans l'échantillon.

Il existe aujourd'hui plusieurs bases de données regroupant des informations sur les ARNr dont les principales sont GenBank (NCBI, 2015b), Ribosomal Database Project (RDP, 2015) et EMBL (EMBL, 2015). Grâce à ces connaissances, il est possible de mettre au point des amorces PCR spécifiques à des espèces, genres,... ou même phylums. Dans ce dernier cas, les amorces sont appelées « amorces universelles » (Cocolin *et al.*, 2002; Khot *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; El Sheikha *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2000).

Ces connaissances peuvent être utilisées dans l'utilisation de méthodes moléculaires pour la caractérisation et la quantification de champignons et de bactéries.

5.3. Techniques de caractérisation moléculaire : empreinte moléculaire

Ces techniques permettent de caractériser le contenu en microorganismes d'échantillons différents. La comparaison de ces derniers permet d'attribuer à chacun un « profil génétique ». Ces techniques impliquent l'amplification de gènes ou de fragments de gènes cibles comme ceux codant pour les

ARNr. Le choix dépend des informations que l'on souhaite obtenir (résolution ou finesse des résultats ; *exemple : différenciation à l'échelle du genre*). Les différences existantes entre les différentes méthodes d'empreinte moléculaire sont dues notamment aux techniques séparatives des échantillons après amplification. On peut les classer en deux catégories : séparation par la taille de l'amplifiat (RFLP, T-RFLP) ; séparation par le contenu nucléotidique de l'amplifiat (SSCP, DGGE / TGGE).

5.3.1. RFLP et T-RFLP

La RFLP pour *Restriction Fragment Length Polymorphism*, qui comme son nom l'indique, est basé sur le principe de restriction par des enzymes. Les ADN cibles (ADNr ou autres) sont d'abord amplifiés par des amorces et les amplifiats sont ensuite digérés par des enzymes de restriction. Il est alors obtenu une quantité et des tailles de fragments différentes selon les échantillons analysés (dans le cas de variations de séquences = variations des sites de restriction). Les fragments sont ensuite séparés sur gel d'électrophorèse. Les profils de restriction obtenus caractérisent les microorganismes de ces échantillons (Pinto *et al.*, 2004; Sabate *et al.*, 2002).

Une variante de cette méthode existe sous le nom de T-RFLP pour *Terminal-RFLP*. Le principe est le même sauf qu'ici, l'une des deux amorces de PCR est marquée par une molécule fluorescente. Ainsi, seule la taille du fragment terminal marqué est détectée et analysée. Cette taille est déterminée par électrophorèse haute résolution. Ces données de fluorescence sont ensuite converties en électrophorégrammes où chaque pic correspond à une taille de fragment. En théorie, chaque pic correspond à un type d'organisme et l'électrophorégramme représente le profil génétique de l'échantillon (Dorigo *et al.*, 2005; Justé *et al.*, 2008; Moeseneder *et al.*, 1999). En agroalimentaire, cette technique a été utilisée notamment pour l'étude de communautés bactériennes présentes dans les yaourts et les fromages (Sánchez *et al.*, 2006), les fruits (Mazzola and Manici, 2012) mais également pour étudier l'évolution microbienne chez les poissons (Rudi *et al.*, 2004).

Cette méthode peut cependant donner des faux positifs. En effet, il est possible qu'une même espèce de microorganisme possède plusieurs copies différentes des gènes codant pour les ARNr. Ainsi, le profil de restriction pour un microorganisme peut être multiple, entraînant plusieurs pics sur les électrophorégrammes. Aussi, plusieurs espèces peuvent avoir le même profil de restriction ce qui entraînera une sous-estimation du nombre d'espèces (Justé *et al.*, 2008; Spiegelman *et al.*, 2005).

5.3.2. SSCP

La SSCP pour *Single Strand Conformation Polymorphism* est une technique qui permet la séparation de molécules d'ADN (amplifiats de PCR) en fonction de leur contenu en nucléotide. Une PCR est réalisée avec des amorces ciblant les gènes des ARNr par exemple. Les amplifiats préalablement dénaturés sont déposés sur un gel non dénaturant. Déshybridées, les molécules d'ADN adoptent une conformation tridimensionnelle dépendante de leur contenu en nucléotides. Ces différentes formes, même si leur taille est identique, vont avoir des comportements électrophorétiques qui ne seront pas les mêmes : vitesse de migration dans le gel.

Cette technique, d'abord développée pour étudier les mutations de gènes, permet de distinguer des fragments divergents d'un seul nucléotide (Hayashi, 1991; Orita *et al.*, 1989) et grâce à sa sensibilité, permet de détecter des espèces présentes à moins de 1,5 % dans les échantillons (Lee *et al.*, 1996). Pour les matrices alimentaires (Justé *et al.*, 2008), elle est utilisée pour l'étude des flores du fromage (Delbès *et al.*, 2007; Samelis *et al.*, 2011) ainsi que celles de la baie de raisin (Grube *et al.*, 2011; Schmid *et al.*, 2011).

5.3.3. DGGE et TGGE

Ces techniques ont d'abord été mises au point pour l'étude de mutation génétique. La DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) et la TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) sont fondé sur la séparation par électrophorèse de fragments d'ADN inférieurs à 500 pb sur gel de polyacrylamide avec gradient dénaturant. La différence entre les 2 se fait sur le mode de dénaturation appliqué ; pour la DGGE, le gradient dénaturant est chimique (urée et formamide (Fodde and Losekoot, 1994)) alors que pour la TGGE, le gradient dénaturant est physique (augmentation progressive de la température (Zoetendal *et al.*, 1998)). Les molécules d'ADN à analyser possèdent potentiellement des températures de fusion différentes si leur contenu génétique diffère. Lors de la migration, la mobilité des amplifiats dans le gel décroît en même temps que l'ouverture de la double hélice d'ADN se dénature et s'ouvre. On obtient alors un profil génétique pour chaque échantillon où une bande correspond théoriquement à un microorganisme.

Plus particulièrement, la DGGE ou PCR-DGGE (car associée à une étape de PCR obligatoire) permet la séparation des brins d'ADN en fonction de leur contenu en base A, T, G et C. Les fragments ayant un fort pourcentage en GC seront plus difficilement dénaturés que les fragments plus riches en bases A et T. Lors de la migration induite par le champ électrique, les ADN vont migrer dans le gel et rencontrer des concentrations en urée et formamide de plus en plus élevées, entraînant une dénaturation progressive mais non homogène dans le temps. Il n'est donc pas possible de prévoir à l'avance la distance de migration d'un amplifiat en fonction de son contenu en nucléotide. En effet, la dénaturation opère de domaine en domaine et à chaque zone dénaturée, la molécule d'ADN change de conformation, modifiant ces propriétés de migration dans le gel (Ferris *et al.*, 1996). La résolution de cette technique est optimale lorsque l'ADN n'est pas entièrement dénaturé. Pour cela, les migrations sont effectuées à des températures comprises entre 55 et 65 °C (en général 60 °C) ce qui conditionnera l'équilibre de dénaturation. Afin d'éviter que la double hélice ne se dénature totalement, une queue GC (ou GC *clamp*) est ajoutée à une des extrémités assurant ainsi une très forte liaison (les bases G et C forment 3 liaisons hydrogènes intermoléculaires alors que les bases A et T n'en forme que 2) (Sheffield *et al.*, 1989).

Que ce soit pour les bactéries et pour les champignons, l'aptitude à discerner plusieurs échantillons différents est dépendante du choix des amorces pour la PCR. Elles se font par rapport à l'objectif recherché ; comparaison d'espèce / genre (plus résolutif) ou comparaison de famille / ordre (moins résolutif) (Adachi *et al.*, 1996). En quelques mots, pour une étude très résolutive, le choix des amorces se fera dans des régions conservées des ADN encadrant des régions hypervariables (Cocolin *et al.*, 2000; Massias, 2008; Möhlenhoff *et al.*, 2001; El Sheikha *et al.*, 2012). La zone à amplifier doit posséder une température de fusion (T_m : *Temperature melting*) faible et la GC *clamp* doit être

positionné à l'extrémité possédant la plus haute T_m . Une connaissance préalable des zones à amplifier est donc nécessaire.

Les techniques de TGGE et DGGE permettent d'analyser plusieurs échantillons différents en même temps et d'obtenir des données qualitatives et semi-quantitatives. Les profils génétiques obtenus (dans les conditions définies) sont comparés entre eux. L'autre intérêt est la possibilité de prélever les bandes d'intérêt, de les cloner et de les séquencer même si les informations recueillies restent limitées compte-tenu de la faible longueur des amplifiats (Ogier *et al.*, 2002).

D'autre part, chaque bande correspond théoriquement à une espèce (ou groupe). Pour pouvoir identifier l'appartenance de chaque bande à une espèce, un profilage électrophorétique individuel est nécessaire. Cependant, l'étude des communautés microbiennes (Muyzer *et al.*, 1993) au cours du temps et selon leur provenance est possible ; bactériennes (Muyzer and Smalla, 1998; Nisiotou *et al.*, 2011) ; fongiques (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; El Sheikha *et al.*, 2012). Comme la SSCP, ces techniques sont particulièrement sensibles et permettent la différenciation de deux ADN divergents d'un seul nucléotide (Muyzer, 1999) et de détecter les flores présentent à plus de 1 % (Muyzer *et al.*, 1993; Ogier *et al.*, 2002).

5.4. Limites des méthodes moléculaires

Différents biais peuvent apparaître lors du profilage génétique des échantillons, notamment lors des étapes d'échantillonnage, d'extraction, d'amplification et de séparation.

Lors de l'échantillonnage, si l'extraction des ADN ne peut pas être faite immédiatement, la conservation des échantillons est nécessaire. Les conditions doivent être adéquates afin de ne pas abîmer les acides nucléiques. Les étapes de stockage, de transport, de refroidissement doivent être maîtrisées. Par exemple, lors de la congélation, les cellules vont avoir tendance à éclater, répandant le contenu cellulaire dans l'échantillon. L'ADN se retrouve alors en contact avec des enzymes microbiennes qui pourront le dégrader. Des précautions pour éviter ces lyses sont nécessaires comme la conservation dans la glace pendant et après la décongélation pour inhiber les enzymes.

L'extraction de l'ADN est très sensible. Elle a pour vocation dans un premier temps de lyser les cellules et de purifier les acides nucléiques dans un second temps. Tous les microorganismes n'ont pas les mêmes résistances aux contraintes enzymatique, chimique et physique selon leur état physiologique (végétatif ou dormance), la composition de leur paroi (chitine, Peptidoglycane,...). Il est donc nécessaire de trouver un compromis pour les échantillons possédant une hétérogénéité d'espèces. Par ailleurs, l'extraction des ADN peut aussi bien être réalisée sur les cellules vivantes que sur les cellules mortes à condition que celles-ci aient été conservées dans de bonnes conditions pour le maintien du contenu génétique. De plus, la présence de molécules polluantes telles que les lipides, polysaccharides, protéines, sels, acides humiques,... peuvent entraîner des pertes de rendement d'extraction et altérer les étapes d'amplifications par PCR. Les kits d'extraction commerciaux sont dotés pour la plupart le système de purification permettant de limiter ces polluants (colonne par exemple (Macherey-Nagel, 2015)).

L'amplification par PCR est l'étape clé et commune à toutes les méthodes d'empreintes moléculaires. La présence d'inhibiteur dans le milieu réactionnel peut avoir beaucoup de

conséquence sur l'efficacité de la réaction. Les conditions physico-chimiques (concentrations en sel, pH,...) sont importantes mais sont en général maîtrisé par les mix de PCR commerciaux. Ensuite, dans une réaction de PCR, la polymérisation peut se faire de façon préférentielle entraînant des biais sur les quantités amplifiées. Cela peut venir du choix des amorces, de la composition en GC (température d'hybridation), de la conformation spatiale de la zone à amplifier (Dutton *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1998).

Enfin, chaque bande ou pic dans les méthodes d'empreintes moléculaires correspond en théorie une espèce donnée. En réalité, un même organisme peut donner plusieurs bandes bien distinctes. Il existe au sein du génome des cellules des répétitions de séquence. Ces répétitions peuvent dans certains cas diverger de quelques paires de bases. C'est le cas pour les gènes codant pour l'ARNr (Gelsomino *et al.*, 1999).

Tableau VIII : tableau récapitulatif des avantages et inconvénients spécifiques aux techniques d'empreintes moléculaires. D'après (Marques Martins, 2012) adapté de (Hurst *et al.*, 2007; Kirk *et al.*, 2004).

Technique	Principe de séparation	Avantages	Inconvénients
T-RFLP	Polymorphisme de séquences de taille des fragments	Automatisable : Permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillon ; très sensible et reproductible	Dépend de la performance de la digestion enzymatique ; Intérêt de combiner plusieurs enzymes
SSCP	Polymorphisme de séquences de fragments	Automatisable (CE-SSCP) : Permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons ; sensible et reproductible ; Dispense d'une étape de digestion enzymatique	Ré-appariement de brins : présences de plusieurs bandes provenant d'une seule espèce
DGGE / TGGE	Polymorphisme de séquences de fragments	Très sensibles, permet de distinguer deux fragments divergents d'une seule pb ; Possibilité d'exciser des bandes d'intérêt et de les séquencer	Plutôt longue à mettre en œuvre, fragments de faibles tailles limitant l'étude phylogénétique par la suite ; Ne permet pas de résoudre ni des séquences très riches en GC ni des écosystèmes complexes.

Malgré leurs limitations, les techniques d'empreintes moléculaires restent des outils de choix pour l'étude des communautés microbiennes que l'étude soit géographique ou temporelle.

III. Matériel et méthodes

1. Matières premières utilisées

1.1. La pomme

1.1.1. Choix de la variété et des parcelles

Pour notre étude, la pomme Golden (*Malus domestica* cultivar Golden Delicious) a été choisie. Ce fruit est la première variété commercialisée en Europe et représente $\frac{1}{4}$ de la production, toutes variétés confondues. Sa culture peut être faite notamment en agriculture conventionnelle, raisonnée ou biologique. Dans la vallée de la Garonne (Sud-Ouest de la France), il existe plusieurs lieux de production de ce fruit. Les pommes issues de l'agriculture conventionnelle (C) proviennent d'un producteur qui utilise des traitements phytosanitaires issus de la pétrochimie. Le Conservatoire végétal d'Aquitaine nous a fourni des Golden à l'état naturel, n'ayant subi aucun traitement (NT) et des pommes en agriculture raisonnée (R). Enfin, le dernier type de fruit provient de l'agriculture biologique (B) (cf. Annexe II : Tableau XLVIII et Tableau XLIX).

Les localisations géographiques des vergers ainsi que des photos sont disponibles en annexe (cf. Annexe II : Figure 103 à Figure 111).

1.1.2. Déroulement de l'étude

L'étude de la flore microbienne des pommes s'étale sur plusieurs mois. A chaque étape, des analyses microbiologiques sont réalisées (Figure 14).





	Biologique	Conventionnelle	Raisonnée	Non traitée
				
J-7 avant récolte		<ul style="list-style-type: none"> - Analyse microbiologique - Analyse en biologie moléculaire 		
J-0 Récolte		<ul style="list-style-type: none"> - Analyse microbiologique - Analyse en biologie moléculaire 		
	Stockage chambre froide		Quantités insuffisantes	
J + 1 Mois				
J + 2 Mois		<ul style="list-style-type: none"> - Analyse microbiologique - Analyse en biologie moléculaire 		
J + 4 Mois				
J + 8 Mois				

Figure 14 : plan du déroulement de l'étude

Pour chaque type de culture, la liste des intrants et la date des traitements sont regroupées dans l'Annexe II (Tableau XLVIII et Tableau XLIX).

1.1.3. Technique de prélèvement et stockage des pommes

Les techniques de prélèvement pour les 4 types de pommes Non Traitées, Raisonnées, Bio et Conventionnelles sont les mêmes. Chaque fruit est cueilli à l'aide de matériel désinfecté à l'éthanol 70 %. Sur l'arbre, les fruits sont prélevés en conditions aseptiques et sont mis dans un sachet plastique stérile et le pédoncule est ensuite coupé à l'aide de ciseaux (Figure 15). Les prélèvements de pommes s'effectuent dans les haies fruitières en quinconce tous les 3 mètres (soit un total de 216 fruits pour chaque verger Conventionnel (Figure 16) et Bio (Figure 17)). La distance au sol doit être comprise entre 1,5 et 2,0 m. Les fruits protégés par une feuille ou trop exposés au soleil direct sont écartés.



Figure 15 : méthode de prélèvement des fruits sans contact physique



Figure 16 : verger en agriculture conventionnelle



Figure 17 : verger en agriculture biologique

Le stockage au froid ne concerne que les fruits Bio et Conventionnels. Les lots de fruits prélevés ont été déposés de façon aléatoire dans des caisses plastiques préalablement nettoyées et désinfectées. Les caisses de chaque lot Bio et Conventionnel ont été placées dans 2 caissons étanches distincts de 200 L aseptisés. Afin d'évacuer le surplus d'humidité et de molécules de maturation comme l'éthylène, un flux d'air filtré à 0,1 μm est diffusé en permanence à l'intérieur du caisson à un débit de 40 L/h environ. Ces caissons sont placés dans une chambre froide à 0-1 °C. L'hygrométrie est maintenue à un taux compris entre 85 à 95 % par passage de l'air dans une eau stérile avec suivi de la température et de l'humidité (cf. Annexe II : Figures 112 et 113).

1.1.4. Caractérisation physico-chimique de pommes

Afin d'étudier l'incidence d'un traitement assainissant sur les caractéristiques organoleptiques et nutritives des pommes, leur couleur a été analysée par colorimétrie. Les polyphénols ainsi que le pouvoir antioxydant de l'épiderme ont été dosés.

1.1.4.1. Mesure des paramètres colorimétriques

Les mesures ont été effectuées grâce à un colorimètre de type Konica Minolta CR-400 connecté à un ordinateur et géré via le logiciel Spectra Magic NX. Les paramètres L^* , a^* et b^* sont enregistrés au cours de chaque essai de désinfection, avant et après le traitement assainissant dans le but d'évaluer l'impact éventuel de celui-ci sur la couleur des pommes. Dans le système colorimétrique défini par la Commission Internationale d'Eclairage (CIE Lab), le paramètre L^* correspond à la luminosité, représentant le degré d'éclaircissement ou d'assombrissement d'une couleur. L^* varie sur une échelle linéaire allant de 0 (noir) à 1 (blanc) ; il est exploité pour évaluer le brunissement. Le paramètre a^* indique par sa variation sur un axe horizontal les différentes teintes allant du vert (valeur négative) au rouge (valeur positive). Le paramètre b^* de la même façon indique sur un axe vertical les différentes teintes entre le jaune (valeur positive) et le bleu (valeur négative) (Annexe V : Figure 118).

1.1.4.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux est effectué sur des échantillons d'épiderme de pommes traitées ou non (témoin). La réalisation de ce dosage s'effectue en deux temps :

- l'extraction des composés phénoliques totaux des échantillons : 2,5 g de produit sont mélangés à 12,5 ml d'un solvant méthanol / HCl 1,2 M (50/50, v/v). La réaction acide permet de cliver les liaisons entre les polyphénols et les parois végétales. L'ensemble est hermétiquement fermé puis chauffé pendant deux heures sous agitation à 90 °C dans un bain d'huile de silicone. A l'issue de ces deux heures les échantillons, une fois refroidis, sont centrifugés deux fois 10 min à 10 000 rpm et le surnageant est récupéré.
- la mesure du taux de ces composés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Pour ce faire, 0,4 ml de surnageant sont mélangés à 1,5 ml d'eau milli-Q dans une fiole de 10 ml. Puis leur sont ajoutés 0,4 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et, au bout de 6 min, 4 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7 % pour stopper la réaction. Enfin, la DO de l'échantillon est lue au bout de 90 min, au spectrophotomètre UV-visible (Uvikon 933) à 760 nm. Pour chaque série d'échantillon, un blanc ne contenant aucun polyphénol et un témoin positif contenant de l'acide gallique (polyphénol) sont préparés et dosés en parallèle. Les quantifications sont effectuées par rapport à la gamme d'étalonnage de l'acide gallique (Figure en annexe). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par kg de poids sec. Un témoin possédant une concentration connue en acide gallique de 0,25 g/L permet d'ajuster la DO de référence par rapport à la gamme étalon. (Massias, 2015).

1.1.4.3. Dosage de la capacité antioxydante

Le dosage est effectué par la méthode AAEAC (*Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity*) consistant à mesurer par spectrophotométrie (à 734 nm) la capacité du végétal à piéger les radicaux libres et donc à ralentir ou inhiber l'oxydation (Re *et al.*, 1999). Les radicaux libres formés *in vitro* à partir de sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzthialozine-6-sulfonique) ou ABTS (Sigma-Aldrich, USA) sont des cations. Le substrat est d'abord oxydé dans des conditions standards pendant un temps défini puis l'étendue de l'oxydation est mesurée. 3 x 0,5 g d'échantillon sont disposés dans des béchers contenant chacun 10 g de solution d'extraction éthanol / eau (50/50, v/v). Les échantillons sont broyés à l'Ultra-turrax et centrifugés 10 min à 10 000 rpm. Le surnageant est récupéré et centrifugé de nouveau à 10 000 rpm pendant 10 min. 40 µl de surnageant sont prélevés et ajoutés à 1 690 µl d'ABTS dont la DO (Densité Optique) initiale est de 0,700. Le tube contenant le surnageant et l'ABTS est mélangé 30 sec puis la DO est lue au bout de 1 min à 734 nm avec un spectrophotomètre Helios γ (Thermo Electron Corporation, USA). Selon les résultats de Re *et al.*, la réaction de la majorité des antioxydants avec l'ABTS est complète à 1 min, excepté pour les cyanidines et glutathione qui montrent une inhibition jusqu'à 4 min de réaction (Re 1999). Ce qui signifie que la capacité antioxydante est relative à 1 min et non totale. Pour connaître la variabilité inter- et intra-échantillon, 6 mesures sont réalisées sur 3 sous-échantillons d'un même échantillon, soit 18 mesures/échantillon. Le pourcentage d'inhibition est calculé d'après la formule suivante :

$$\%_{\text{inhibition}} = ((DO_i - DO_f) / DO_i) \times 100$$

avec DO_i : DO initiale de la solution d'ABTS^{•+}

DO_f : DO finale de la solution d'ABTS^{•+} avec
l'antioxydant à analyser

La capacité antioxydante AAEAC est exprimée en mg d'EAA (équivalent acide ascorbique) / g de poids sec.

1.2. Coproduits végétaux d'origine agricole

Le coproduit végétal, la rafle de maïs, est pré-broyé en BR1 (par le fournisseur). Un second pré-broyage donne BR2. Celui-ci est composé de Flocons et de Granulats qui peuvent être séparés. Après leur séparation, le Granulat subit 3 broyages successifs donnant par tamisage les Poudres 1, 2 et 3 (différenciées par leur granulométrie) (Figure 18). Ces différents produits sont riches en cellulose et hémicellulose (à plus de 70 %).

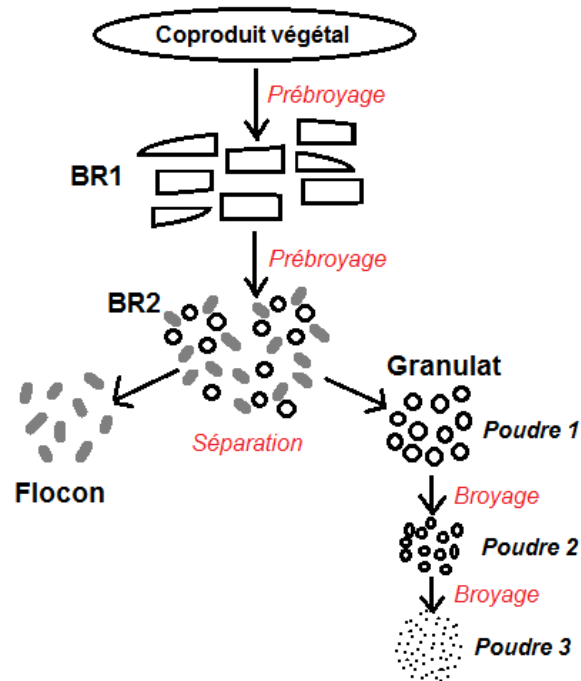


Figure 18 : schéma du process de transformation du coproduit

Poudre 1 : 2,0 mm < > 4,5 mm Poudre 2 : 180μ < > 600μ Poudre 3 : < 250μ (poudre impalpable)

2. Méthode de quantification et d'identification microbienne

2.1. Milieu de cultures microbiennes

Les milieux de cultures utilisés en fonction des espèces sont reportés dans le Tableau IX.

Tableau IX : milieux et conditions de culture des différentes flores et microorganismes

Espèces	Condition de culture*	Milieu liquide		Condition de culture	Milieu gélosé			
		Muller Hinton (Biokar)	Sabouraud (Biokar)		Sabouraud au chloramphénicol (Biokar)	PDA (Biokar)	TBX (Biokar)	PCA (Biokar)
<i>E. coli</i>	30 °C 24 h	X		30 °C 24 h			X	X
<i>B. subtilis</i>	30 °C 48 h 7 jours (spores)	X		30 °C 48 h				X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30 °C 48 h		X	30 °C 48 h	X			
<i>Fusarium graminearum</i>				25 °C 10 jours	X	X		
<i>A. niger</i>				25 °C 10 jours	X	X		
FAM				30 °C 72 h				X
Levures / moisissures				25 °C 5 jours	X			

* Milieu liquide : agitateur va-et-vient bain-marie 120 rpm

Les précultures sontensemencées à partir de colonies issus de boîtes d'isolement (100 mL de bouillon dans des erlenmeyers de 250 mL). 1 mL de ces précultures a servi pour ensemen- cer les cultures pour les différents microorganismes.

2.2. Méthodes de décrochage des microorganismes

Deux méthodes ont été choisies pour le décrochage des microorganismes : décrochage par sonication et par homogénéisation. La technique de prélèvement des épidermes est commune aux deux méthodes. Les pommes sont pelées en condition stérile à l'aide d'un pèle-pomme à manivelle

(Kaly Tellier, France) pour obtenir des épaisseurs inférieures à 1 mm. 10 g d'épiderme sont prélevés et mis dans 90 mL de tryptone (dilution au 1/10).

- Méthode de décrochage par sonication (Chand-Goyal and Spotts, 1997)

Les tubes sont plongés dans le bain à ultrason (Deltasonic Aerosec 11 CT, France)

- Méthode de décrochage par homogénéisation

Les sacs sont placés dans le Bagmixer (Interscience, France), sont malaxés (vitesse 8, force maximale) et des prélèvements sont effectués à différentes temps.

2.3. Méthode de dénombrement

2.3.1. Dénombrement par comptage des colonies (Méthode de référence : MdR)

Les suspensions microbiennes ont étéensemencées sur milieu gélosé (Tableau IX) soit par étalement manuel de 0,1 mL, soit par méthode Spiral (Don Whitley Scientific, USA) avec 0,05 mL. Les ensemencements ont été réalisés en double. Après incubation, les colonies sont dénombrées.

Pour éviter le développement de la flore fongique, de la cycloheximide a été ajouté à 25 mg / L dans la gélose PCA pour certains essais.

2.3.2. Dénombrement par méthode Tempo® (Méthode alternative : MA)

Le détail des protocoles d'ensemencement du Tempo® (Biomérieux, USA) est présenté dans l'annexe Annexe III (Figure 114 et Figure 115).

Tableau X : cartes Tempo® et conditions de culture des différentes flores et microorganismes

	Conditions de culture	TVC	TC	YM
<i>E. coli</i>	30 °C	X	X	
	24 – 27 h			
<i>S. cerevisiae</i>	30 °C			X
	48 h			
<i>B. subtilis</i>	30 °C	X		
	40 – 48 h			
FAM	30 °C	X		
	40 – 48 h			
Levures / moisissures	25 °C			X
	72 – 76 h			

3. Biologie moléculaire

3.1. Souchothèque fongique et bactérienne

Les colonies issues des comptages ont été différenciées macroscopiquement et à l'aide d'une loupe binoculaire. Pour chaque type de morphologique retrouvé sur les boîtes, 3 colonies ont été repiquées pour chaque boîte et chaque type de pommes. Les colonies sont repiquées séparément sur un milieu gélosé de même nature. Chaque boîte est conservée entre 8 et 10 °C. Les colonies n'étant pas recultivables sont prélevées et congelées. Chaque échantillon a subi une extraction d'ADN et a été identifié par biologie moléculaire (cf. IV. 3.4. Identification par séquençage et par PCR-DGGE).

3.2. Extractions d'ADN

Les extractions des ADN totaux des micro-organismes de la pomme sont réalisées à partir de culots cellulaires obtenus après centrifugation des broyats des épidermes de pommes (pour le dénombrement). Un mix enzymatique est utilisé avant l'extraction avec le kit d'extraction NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Allemagne). Pour les cultures cellulaires liquides, 10 mL de suspension cellulaire sont centrifugées puis nettoyées. Le culot est repris dans 1 mL de Tris EDTA (TE) (pH 8). 200 µL sont utilisés pour l'extraction. Pour les champignons filamenteux, 50 mg de mycélium frais sont mis directement dans les tubes du kit d'extraction dilués dans 200 µL de TE. Pour les champignons sporulés, 3 mg de spores sont prélevés.

Les tubes ont ensuite incubés avec du lysozyme (22 mg / mL) (Sigma) et de la lyticase (300 U / mL) (Sigma) dans le même mix pendant 1 h à 37 °C. Ensuite, 200 µL de TE sont ajoutés et les échantillons sont placés dans les tubes de billes de silice du kit NucleoSpin® Soil. Ils sont ribolysés 15 sec ; puissance 5,5 (Ribolyser Hybaid). Le mélange est ensuite incubé avec la protéinase K (60 mUA / mL) (Sigma) pendant 2 h à 56 °C. Enfin, le protocole du kit NucleoSpin® Soil est suivi (Broyage au Ribolyser (Hybaid) 30 sec ; puissance 5,5). L'ADN est repris dans 50 µL de SE (tampon d'élution).

La quantité d'ADN est estimée au NanoDrop™ à 260 nm (Thermo Scientific) et les échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1,5 % pour contrôler la qualité des extractions.

Dans le même objectif, de l'ADN de pomme a été extrait. Pour cela, 2 extractions différentes ont été effectuées.

- Extrait d'épiderme : une pomme Golden bio est passée au bain-ultrason pendant 2 min (Deltasonic Aerosec 11 CT, France), puis trempée 5 min dans l'éthanol 70 % et rincée 2 min dans de l'eau ultra-pure stérile. Elle est enfin égouttée sous une hotte à flux laminaire. L'extraction d'ADN est la même que présentée en amont pour les microorganismes.
- Extrait de pépin : les pépins (normalement exempts de contamination microbienne) sont récupérés, stérilisés par flambage puis décorticulés. Les cellules germinales sont récupérées et placées dans un creuset gelé à - 80 °C. Elles sont écrasées avec un pilon dans l'azote liquide. Le broyat (poudre) est alors utilisé selon le protocole d'extraction NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, USA).

3.3. Dénombrement par qPCR

Les échantillons sont préparés de la même façon que pour la flore cultivable. Après avoir obtenu le broyat de peau de pommes, 15 mL de cette suspension sont mis dans un tube à centrifugation. Les tubes sont centrifugés à 9800 g (4°C, 15 min). Les culots sont lavés dans 5 mL d'eau physiologique et sont de nouveau centrifugés. Le culot est ensuite stocké à -20°C.

Les culots congelés sont mis dans la glace et repris dans 1 mL de TE. L'extraction d'ADN est effectuée dans les mêmes conditions que pour les cultures pures avec 200 µL de ce mélange.

La quantité d'ADN est contrôlée au NanoDrop™ (Thermo Scientific) et les échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1,5 % pour contrôler la qualité des extractions.

Les PCR sont réalisés dans des plaques blanches 96 puits (Biorad, USA) avec un volume réactionnel par puits de 12,5 µL.

Les Master Mix utilisés sont :

- Maxima Probe qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, USA). La concentration en amorce est de 0,3 µM et celle en sonde de 0,2 µM.
- Maxima SYBR qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, USA). La concentration utilisée en amorce est de 0,2 µM pour chaque mélange réactionnel.

Les qPCR sont réalisés sur un Chromo 4 (Biorad, USA) ou CFX96 (Biorad, USA) avec les conditions définies dans les résultats de mise au point (cf. IV. 3. Développement d'une méthode de dénombrement par PCR en temps réel).

3.4. Identification par séquençage et par PCR-DGGE

Le séquençage des espèces a été réalisé avec des amorces dessinées dans des régions conservées englobant une région variable. Pour les champignons, les amorces Fungi49 amplifient une partie de la région D2 de l'ARN Ribosomal 26 S pour une longueur de 1400 pb (Tableau XI).

Tableau XI : amorces utilisées pour l'amplification et l'identification des champignons

Séquences		T _m (°C)	Région <i>S. cerevisiae</i>
Amorce Sens : Fungi 5,8 S	5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAAC -3'	48	1400 pb
Amorce Antisens : Fungi 28 S	5'-CTAATCATTCGCTTTACCTC-3'	44	

L'extraction d'ADN par un kit n'est pas obligatoire pour le séquençage. Une colonie est mise dans un microtube 0,5 mL avec 30 µL d'eau stérile. Les contenus des tubes sont homogénéisés et sont placés à 95 °C pendant 5 min afin d'éclater les cellules. Les lysats sont utilisés pour la PCR.

N.B. : les espèces les plus résistantes sont extraites avec le kit MN.

Pour les amorces Fungi 49 ; le protocole est similaire sauf la phase d'hybridation qui s'effectue à 49 °C. Les échantillons sont ensuite déposés et quantifiés sur gel d'agarose 1,5 %.

Pour l'envoi au séquençage, il est nécessaire d'avoir des échantillons présentant une concentration minimale de 60 ng / µL d'ADN (Cogenic, England).

Pour les amplifications qui n'auraient pas une concentration suffisante pour être séquencés, la PCR est reproduite avec des quantités plus importantes (volume réactionnel de 50 à 100 µL). Les échantillons sont ensuite concentrés grâce à une précipitation à l'acétate de sodium 3 M (1 / 10 volumes) / éthanol absolu (2 volumes). Une fois séquencés, les résultats seront analysés et retravaillés par ordinateur avec le logiciel Chromas. Les séquences sont enfin comparées aux bases de données en ligne avec Blast (NCBI) afin d'identifier le genre et l'espèce.

Pour les analyses en PCR-DGGE, l'amplification par PCR est réalisée avec le mix PCR Fermentas (Thermo). Les amorces NL1-LS2-GC (ciblant les levures et moisissures) sont utilisées pour la PCR dans les conditions suivantes ; 4 min à 95 °C, puis 35 cycles de 30 sec à 95 °C, 30 sec à 57 °C et 30 sec 72 °C et enfin, 10 min à 72 °C.

La DGGE est réalisée à 60 °C dans un gel de polyacrylamide 8 % avec gradient dénaturant de 50 à 65 % (urée/formaldéhyde). La migration dure 5 h à 130 V. La révélation est réalisée en plongeant le gel dans un bain de BET (40 µl / L de TAE) pendant 20 min.

Pour l'analyse des bandes, un marqueur moléculaire interne a été établi en fonction des résultats de séquençage des espèces cultivables majoritaires présentes dans les échantillons. Pour les bandes d'ADN qui n'auront pas de référence dans le marqueur, les bandes seront découpées et amplifiées par clonage puis envoyées à séquencer pour être identifiées.

Les amorces NL1-LS2 pour la PCR-DGGE utilisées pour les champignons amplifient la région D1-D2 de l'ARN Ribosomal 26 S. Le fragment amplifié est de 247 pb chez *S. cerevisiae* avec l'amorce direct NL1 et sa queue GC (*souligné*) et l'amorce reverse (Tableau XII) (Cocolin *et al.*, 2000). Ces amorces sont également utilisées en qPCR (cf. IV. 3. Développement d'une méthode de dénombrement par PCR en temps réel).

Tableau XII : amorces utilisées pour l'amplification et la détection de la région conserve de l'ARNr 26 S des champignons, région D1-D2

Séquences		Tm (°C)	Région <i>S. cerevisiae</i>
Amorce Sens : NL1	5'-GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	60,3	247 pb
Amorce Antisens : LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'	55,7	
Amorce NL1-GC Sens	5'- <u>CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG</u> GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'		

4. Traitement assainissant

4.1. Traitements thermiques

4.1.1. Pilote vapeur

Le dispositif de traitement des pommes à la vapeur est un pilote conçu par AGROTEC. Il comprend une enceinte close de traitement (à portes amovibles), reliée à un générateur de vapeur électrique de 36 kW alimenté en eau à Th = 0 °f. La vapeur produite est canalisée (sous contrôle d'une électrovanne) vers l'enceinte où elle est diffusée à travers deux rampes de buses (Figure 19).

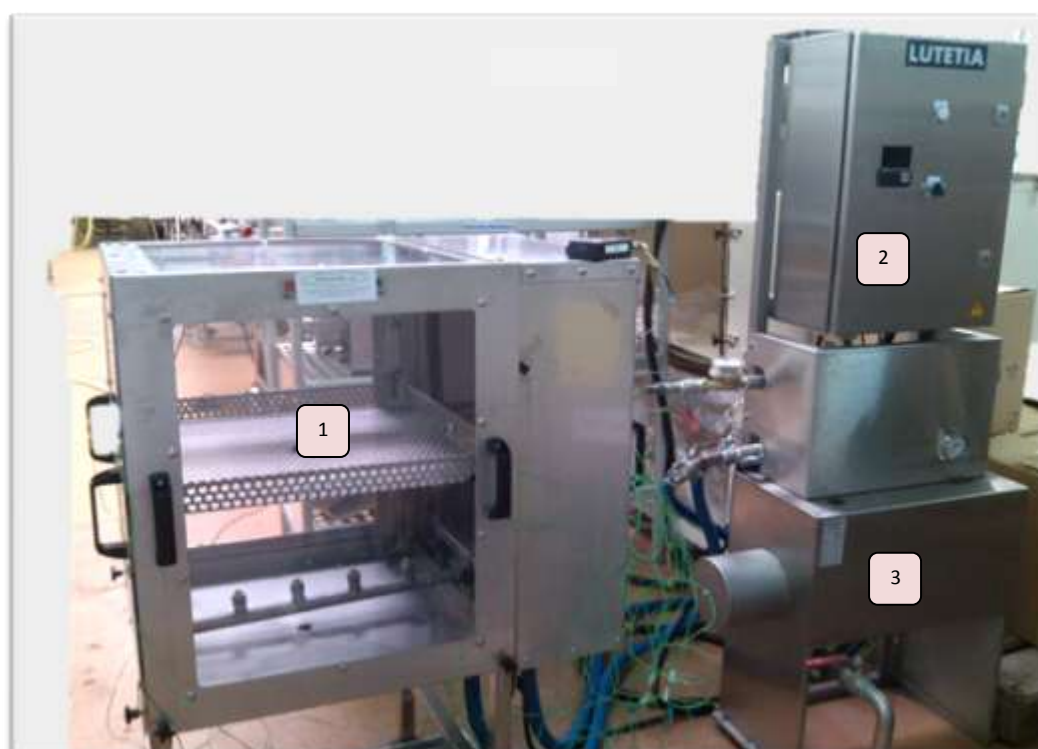


Figure 19 : dispositif de traitement à la vapeur ; 1) Enceinte ; 2) Boîtier de contrôle ; 3) Réservoir d'eau

Des sondes de mesures thermiques (thermocouples) reliées à des enregistreurs Testo® sont positionnées en neuf points différents dans l'enceinte (Figure 20). La température est enregistrée toutes les 10 sec pendant au moins 20 min.

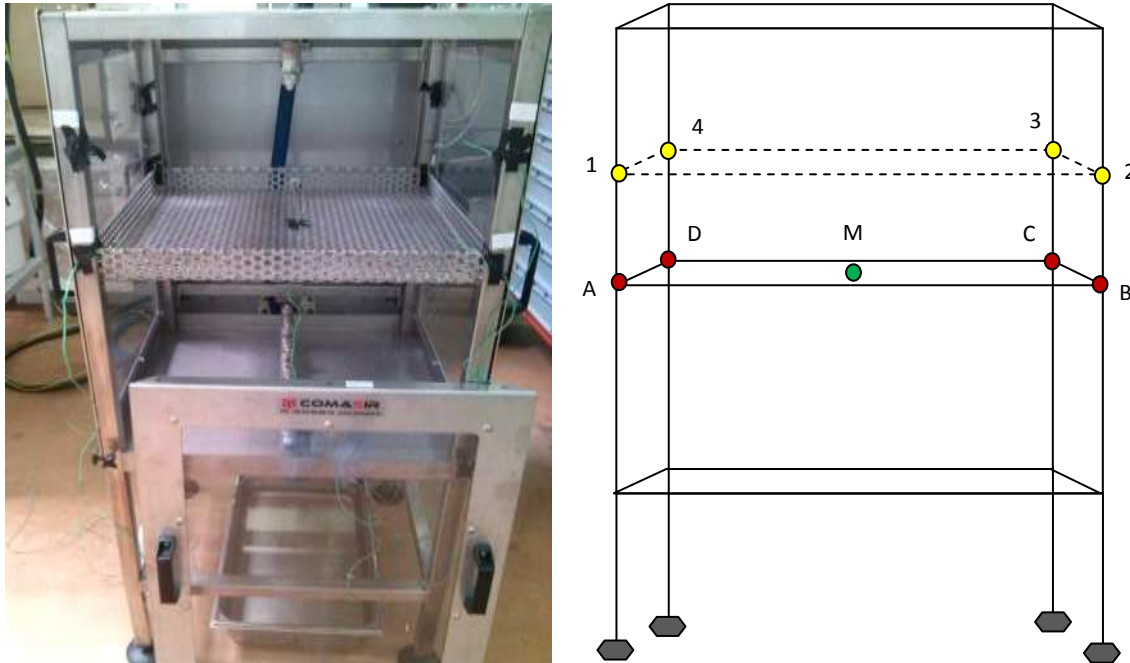


Figure 20 : enceinte de traitement avec le schéma des différentes positions des sondes de mesure de température numérotées de 1 à 4 pour celles en partie haute de l'enceinte ; de A à D pour celles au niveau de la clayette et M pour la sonde centrale

4.1.2. Four en chaleur sèche et humide

Le four est un combiné chaleur sèche / vapeur d'une puissance de 37 kW (Frima FSCC 201, France) (Figure 21). Il possède une capacité de 20 niveaux de clayettes. Il est équipé de sondes de mesure de température et d'hygrométrie permettant l'enregistrement.



Figure 21 : four utilisé pour la désinfection des poudres

4.1.3. Autoclave

L'autoclave, d'une capacité de 54 boîtes 4/4, est un modèle statique vertical de 9 kW (Auriol, France). Il est contrôlé par un automate de régulation / enregistreur possédant 4 sondes de mesure de température.

4.2. Traitement à l'ozone

4.2.1. Ozoneurs pilotes

Nous avons utilisé deux pilotes de génération d'ozone aussi bien gazeux que dissous : Pilote AGROTEC 8 g / L ; Pilote Alphatech 45 g /L (Figure 22).

Pour cela, nous avons travaillé en collaboration avec la société Alphatech (France, Ain 01). Leur principe de production d'ozone est basé sur le système à décharge corona.



Figure 22 : pilote de génération d’ozone de la société Alphatech

4.2.2. Méthode de mesure de l’ozone dissous

Deux méthodes peuvent être utilisées pour estimer la quantité d’ozone dissoute :

4.2.2.1. *Mesure ampérométrique en continue*

La méthode ampérométrique permet la mesure de l’ozone en continue et en parallèle sur un système de production d’eau ozonée.

La sonde de mesure est composée d’une cathode de platine et d’une anode en argent. La mesure du courant se fait grâce aux électrodes. Il est directement proportionnel à la concentration en oxydant. Il existe des sondes dites ouvertes qui sont aspécifiques à l’oxydant et des sondes recouvertes d’une membrane qui ne laisse passer que certaines molécules. Elles sont plus spécifiques que les sondes ouvertes. Avec ces dernières, le maintien d’un flux constant dans l’enceinte de mesure est nécessaire mais elles sont moins coûteuses que les sondes à membrane.

4.2.2.2. *Mesure colorimétrique en batch*

Cette méthode est basée sur la capacité oxydante de l’ozone. Elle consiste à doser l’ozone par spectrophotométrie à l’aide d’un indicateur coloré.

La méthode DPD (N, N-diéthyl-p-phénylène-1,4 diamine) est la plus utilisée. Elle est basée sur l’oxydation de l’iodure de potassium par l’ozone, libérant de l’iode. Cette dernière va oxyder le DPD en un radical semi-quinonique de couleur rose mesurer par spectrophotométrie à 510 nm.

Un millilitre d'eau à analyser est introduit dans une cuve à spectrophotomètre de 2 mL dans laquelle sont présents 18 μL d'Oxycon 2 (iodide de potassium, Swan, Suisse) et 18 μL d'Oxycon DPD (DPD, Swan, Suisse). Après homogénéisation, le résultat est lu au spectrophotomètre dans les 2 min suivant l'ajout de l'eau.

Une gamme étalon a été réalisée (Figure 23) à l'aide d'une solution de iodate de potassium iodurée (Tableau XIII).

Tableau XIII : préparation de la solution de iodate de potassium iodurée pour la courbe d'étalonnage avec la méthode DPD (d'après (Rodier *et al.*, 2009))

Solution étalon d'iodate de potassium iodurée (μL)	0	300	500	1000	2500	5000
Solution d'acide sulfurique 2 N (μL)				100		
Attendre 1 minute						
Solution d'hydroxyde de sodium 2 N (μL)				100		
Eau déionisée				q.s.p 10 mL		
Correspondance* en ozone dissous en mg/mL	0	0,3	0,5	1	2,5	5

* 1 mole d'iodate correspond à 3 moles d'iode ou de chlore

La solution d'iodate de potassium iodurée (100 mL) est préparée comme suit :

- 1 mL de solution d'iodate de potassium à 1,006 g / L (4,7 mmol / L)
- 0,1 g d'iodure de potassium
- Eau q.s.p 100 mL

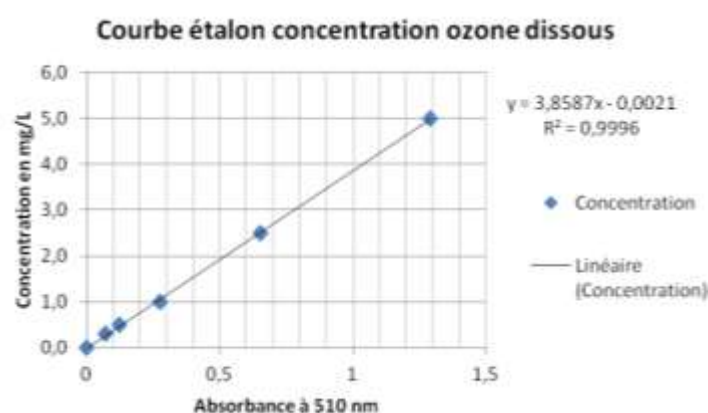


Figure 23 : courbe d'étalonnage pour le dosage des oxydants (ozone et chlore total).

Attention, il est important de noter que cette méthode n'est pas spécifique de l'ozone mais peut également mesurer le chlore total. De ce fait, la gamme étalon ainsi que le zéro doivent être effectuée avec l'eau utilisée pour la dissolution de l'ozone.

4.3. Les tests d'irradiation

4.3.1. Traitement aux UV

Le test d'irradiation consiste à exposer la Poudre aux rayons UV. L'appareil utilisé possède une enceinte en inox surplombée de 4 tubes UV de 15 watts chacun émettant à une longueur d'onde de 254 nm (Figure 24). Afin de limiter le phénomène de « zone d'ombre », la poudre est traitée en couche très fine n'excédant pas 1 à 2 mm d'épaisseur. Ce phénomène est également limité par la présence des 4 sources de rayonnement.



Figure 24 : appareil utilisé pour l'irradiation de la rafle par un rayonnement UV

4.3.2. Traitement par lumière pulsée

Ce traitement consiste à irradier la poudre avec une lampe de très forte intensité lumineuse pendant de très courts laps de temps (inférieur à la milliseconde). Ces essais ont été réalisés en partenariat avec la société Claranor située à Avignon (84).

Afin de faciliter la logistique et le traitement, les poudres contaminées ont été placées dans des sachets plastiques (10 x 15 cm) afin d'obtenir une monocouche de produit. Afin de tester l'efficacité du traitement en fonction de l'épaisseur de poudre, trois quantités de Poudre 2 sont testées. Les sachets sont remplis de la façon suivante :

- Poudre 1 : 15 g par sachet (monocouche)
- Poudre 3 : 20 g par sachet (monocouche)
- Poudre 2 : 20 g par sachet (monocouche), 40 g et 90 g (épaisseurs respectives : < 5 mm, \approx 25 mm et \approx 35 mm)

L'appareil utilisé chez Claranor (Figure 25) est composé de 3 lampes Xenon munie d'un condensateur de 2500 V et d'un réflecteur (dimension 18 x 10 cm). Une plateforme réglable en hauteur permet de définir la distance entre la source et la poudre à traiter. Dans nos essais, la

plateforme où sont déposés les sachets se situe à une distance de 5 centimètres des lampes. Une dose correspond à un flash pour chaque face du sachet.



Figure 25 : dispositif de lumière pulsée

5. Analyses statistiques des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel de statistiques R. Les moyennes des températures, des dénombrements, les dosages des molécules antioxydantes ainsi que les paramètres colorimétriques sont comparés par analyses de variance (ANOVA).

IV. Résultats / discussion

1. Validation de la méthode alternative Tempo®

Nous avons cherché à substituer la méthode de comptage de colonies sur milieu solide (MdR) à une méthode plus rapide et plus fiable (Tableau VII). En effet, la MdR, fastidieuse et coûteuse lors de séries importantes d'échantillons, a la particularité de ne pas être fiable pour des faibles concentrations microbiennes (Annexe I : Tableau XLV). C'est pourquoi, nous avons fait le choix, pour ce travail de thèse, de valider et d'utiliser une méthode de dénombrement rapide semi-automatisée (Tempo®, Biomérieux) afin d'être en mesure de traiter un grand nombre d'échantillons. En l'occurrence cette méthode Tempo® est adaptée pour évaluer les faibles concentrations. Cette méthode est normalisée dans son principe. Pour la validation de cette technique, nous avons étudié la concordance entre la méthode classique de dénombrement et la méthode Tempo®, d'abord avec des souches pures pour les flores naturelles de la pomme.

1.1. Concordance entre la méthode de référence (MdR) et la méthode Tempo® avec des souches pures

Plusieurs études préliminaires ont été réalisées pour valider la concordance entre les méthodes MdR et Tempo®, pour déterminer leur biais, leur linéarité, et cela sur des gammes élargies de concentrations en microorganismes.

Étant donné que la charge microbienne, en quantité et en qualité, d'un aliment varie en fonction de la matrice, nous avons choisi de valider la concordance des résultats dans un premier temps avec deux souches microbiennes pures.

- *E. coli* : cette bactérie GRAM (-) a été choisie comme représentante de la FAM et des coliformes totaux. Cette souche a été utilisée par Biomérieux pour valider certaines matrices alimentaires. Elle permet d'étudier la concordance des cartes Tempo® TVC avec le milieu gélosé PCA (FAM). De plus, elle nous a également permis d'étudier la carte Tempo® TC (spécifique des entérobactéries).
- *S. cerevisiae* : Levure choisie pour sa facilité de culture. Elle permet d'étudier la concordance des cartes Tempo® YM avec le milieu gélosé Sabouraud au chloramphénicol.

Pour chacune des deux souches, nous avons procédé par étape :

- (1) une étude de concordance des 2 méthodes sur des séries de 5 cultures vers la fin de la phase de croissance exponentielle
- (2) l'évaluation du biais et la linéarité des 2 méthodes sur une large gamme de concentrations en microorganismes à partir d'une solution mère
- (3) l'influence de la matrice sur les méthodes

1.1.1. Concordance des méthodes MdR versus Tempo® TVC et TC avec *E. coli*

1.1.1.1. *E. coli* en tant que représentant de la FAM (Tempo® TVC)

Pour l'étude de concordance de la méthode Tempo® avec les MdR, les cartes Tempo® utilisées sont les TVC pour la FAM et les TC pour les coliformes totaux. Pour la MdR, nous n'avons utilisé que le dénombrement sur milieu PCA.

On notera que l'unité du Tempo® retenu par Biomérieux est exprimée en UFC / mL car les résultats ont été évalués en comparaison à ceux obtenus sur boîte de culture. En réalité, son unité est le NPP / mL. C'est cette unité qui sera utilisée dans la suite des travaux.

D'après la Figure 26 et le Tableau XIV, les différences des moyennes obtenues pour chaque série entre les 2 méthodes sont significativement différentes pour les séries 1, 3 et 4. En effet, les valeurs p, significatives pour ces séries, sont respectivement de 0,015, 0,007 et 0,032. En revanche, les séries 2 et 5 sont considérées comme non différentes.

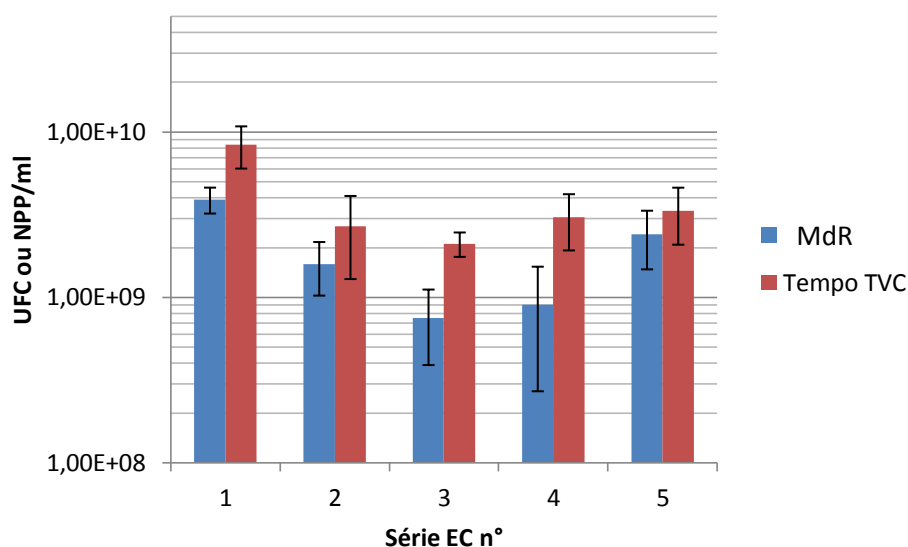


Figure 26 : comparaison des dénombrements des suspensions d'*E. coli* entre la MdR (PCA) et la méthode Tempo®, carte TVC. n=4 (sauf Série n°2 n=3)

Tableau XIV : comparaison des concentrations moyennes et leur valeur P obtenues pour *E. coli* la FAM

Série	Moyenne UFC ou NPP/mL (.10 ⁹)		Test ANOVA		
	Référence	Alternative TVC	Valeur F	Valeur p	Différence significative
1	3,9 ± 0,7	8,4 ± 2,4	10,380	0,015	*
2	1,6 ± 0,6	2,7 ± 1,4	1,869	0,214	
3	0,7 ± 0,3	2,1 ± 0,4	16,51	0,007	**
4	0,9 ± 0,6	3,1 ± 1,1	7,096	0,032	*
5	2,4 ± 0,9	3,3 ± 1,3	1,123	0,325	

Légende : degré de signification ; p-value = 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < 1

D'après ces résultats, la méthode Tempo® (carte TVC) a tendance à surestimer légèrement les concentrations en microorganismes des suspensions par rapport à la MdR. Ce phénomène est très prononcé pour la série 3.

La linéarité des méthodes a été évaluée par un diagramme de dispersion exprimé par l'équation $\log A = f(\log B)$:

- $A = \text{NPP} / \text{mL}_{\text{Tempo}^\circ}$; résultats de dénombrements (en logarithme) de la méthode Tempo®
- $B = \text{UFC} / \text{mL}_{\text{MdR}}$; résultats de dénombrements (en logarithme) de la MdR

La droite de régression « $(\log A) = a (\log B) + b$ » ainsi obtenue nous permet de déterminer la pente « a » et le coefficient de régression R^2 afin d'évaluer la linéarité (avec R^2) et la corrélation (avec a). Le diagramme de différence est réalisé avec l'équation $A - B = f(A + B/2)$. Cette méthode, décrite par Bland et Altman (Bland and Altman, 1999) permet l'évaluation de la concordance (avec la valeur du biais \bar{d}).

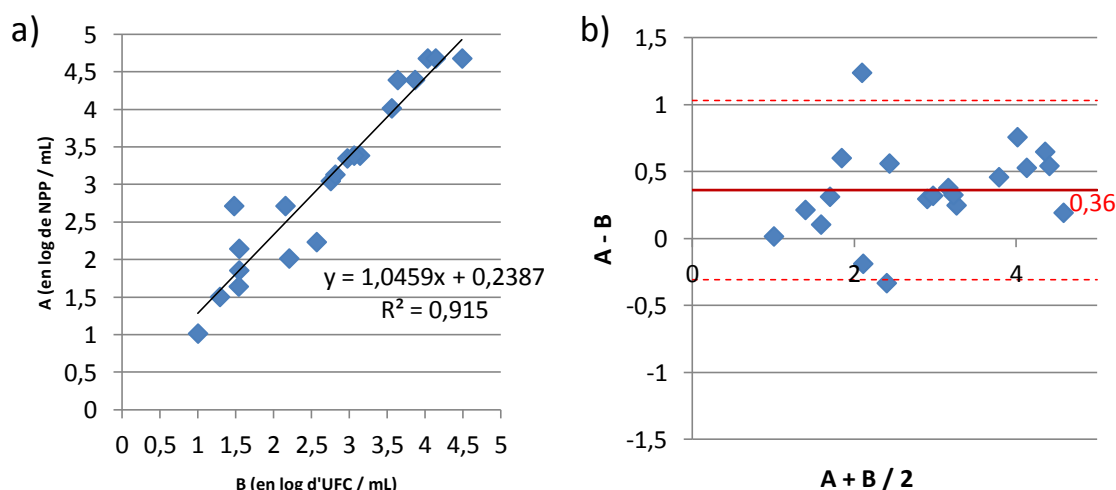


Figure 27 : comparaison de la méthode Tempo® et de la MdR (PCA) pour *E. coli* avec les cartes TVC avec : a) diagramme de dispersion ; b) diagramme de différences

Pour cette étude (Figure 27a), le R^2 se caractérise par une valeur de 0,915 et « a » par une valeur de 1,0459. Dans le cadre de la certification AFNOR de la carte TVC (ISO 16140 : 2003), cette dernière varie de 1,012 à 1,137 en fonction du microorganisme utilisé. Ces résultats sont en accord avec la certification.

Le terme « biais », défini comme la moyenne des différences « \bar{d} », représente la moyenne de l'écart systématique d'une série de mesures par rapport à une autre. En fixant les limites de concordances supérieure et inférieure ($\bar{d} \pm 1,96 \text{ Ecartype}$), nous pouvons évaluer si les deux méthodes de mesures donnent des résultats proches. Le biais sera donc la conséquence d'une différence entre ces deux méthodes. Le diagramme de différences (Figure 27b) abouti aux mêmes résultats que les histogrammes dénombrements. Le biais \bar{d} est de 0,36 avec des seuils de limites de

concordance haute et basse de 1,03 et de -0,31. La méthode Tempo® donne des résultats de dénombrement systématiquement des résultats supérieurs à la MdR car le biais est supérieur à 0.

1.1.1.2. *E. coli* en tant que représentant des entérobactéries (Tempo® TC)

Pour le dénombrement des solutions mères d'*E. coli*, les différences entre les moyennes obtenues par les 2 méthodes sont peu différentes pour les séries 1, 3, 4 et 5 ; exception faite pour la légère différence de la série 2 (avec une valeur p de 0,06) (Figure 28 et Tableau XV).

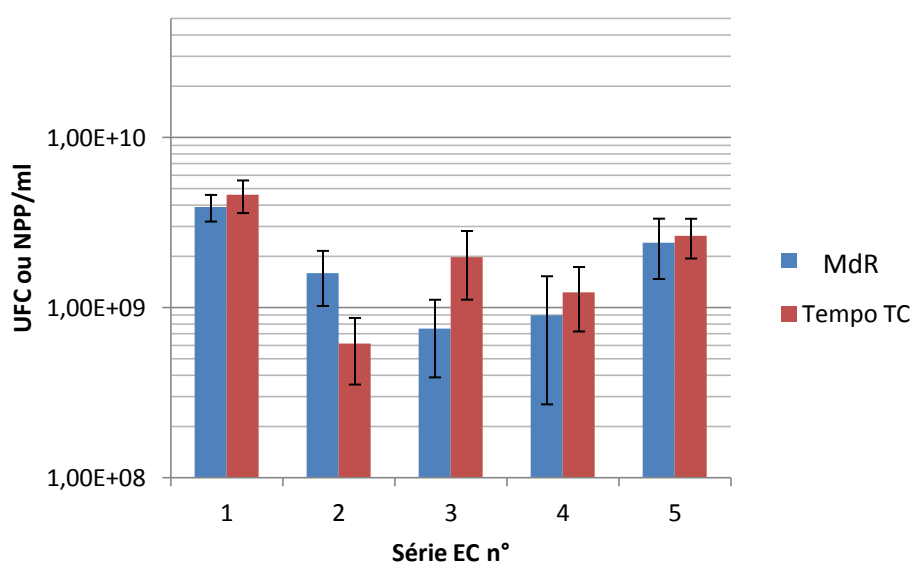


Figure 28 : dénombrement de la solution mère d'*E. coli* avec la MdR (PCA) et la méthode Tempo®, carte TC. n=4 (sauf Série n°2 et 5 n=3)

Tableau XV : Comparaison des concentrations moyennes et leur valeur P obtenues pour *E. coli* avec la carte TC

Série	Moyenne UFC ou NPP/mL (.10 ⁹)		Test ANOVA		
	Référence	Alternative TC	F-Value	p-value	Différence significative
1	3,9 ± 0,7	4,6 ± 1	0,777	0,407	
2	1,6 ± 0,6	0,6 ± 0,3	5,024	0,06	
3	0,7 ± 0,3	2,0 ± 0,8	3,751	0,101	
4	0,9 ± 0,6	1,2 ± 0,5	0,434	0,531	
5	2,4 ± 0,9	2,6 ± 0,7	0,118	0,742	

Légende : degré de signification ; p-value = 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < 1

La droite de régression de la Figure 29a possède une pente de 1,105. Dans le cadre de la certification AFNOR (ISO 16140 : 2003) pour cette carte, les pentes varient entre 0,98 et 1,219 en fonction du microorganisme utilisé. Cette fois encore, les résultats sont en accord avec la certification. Le diagramme de différence (Figure 29b) présente un biais de 0,083 avec des seuils de limites de concordance haute et basse de 0,69 et -0,52. Cela indique les deux méthodes sont concordantes.

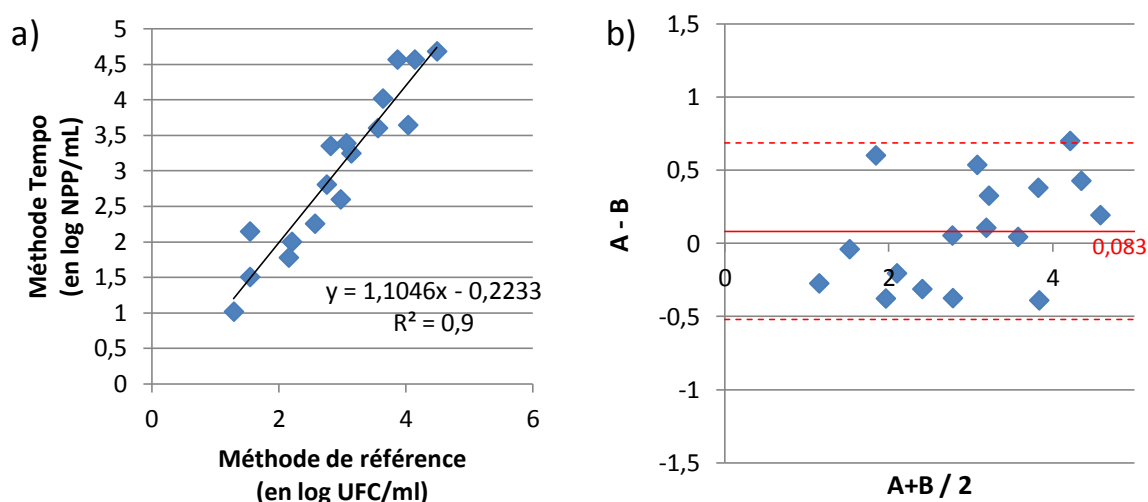


Figure 29 : comparaison de la méthode Tempo® et de la MdR (PCA) dans le cas de dénombrements d'*E. coli* avec les cartes TC avec ; a) diagramme de dispersion ; b) diagramme de différence

Les études de concordance avec les 2 types de carte (TVC et TC) montrent que les résultats obtenus avec la MdR et la méthode Tempo® sont comparables sans différence significative. En revanche, la méthode Tempo® TVC tend à surestimer légèrement les résultats de dénombrement par rapport à la MdR sur gélose PCA.

La validation de la méthode alternative Tempo® obtenue avec des suspensions pures doit être étendue à nos matrices naturelles (épiderme de pommes Bio et Conventionnelles).

1.1.1.3. Effet de la matrice pomme sur le dénombrement de la souche de référence *E. coli* (carte Tempo® TVC et TC)

La concentration d'une suspension mère d'*E. coli* a été définie par la MdR. A partir de cette suspension, des dilutions décimales ont été effectuées dans du broyat aseptisé* (pommes Conventionnelles et Bio) dont on connaît par le calcul la teneur théorique en microorganisme (= valeur cible). Chaque suspension servira à inoculer le milieu de culture des cartes Tempo® avec 2 volumes différents de matrice : 0,1 à 1 mL. Ceci induit une variation du ratio matrice / milieu de culture d'un facteur 4 à 40 (volume des flacons de culture est de 4 mL).

* Le broyat est centrifugé pendant 15 min à 9800 g ; à 4°C. Le surnageant, récupéré stérilement, subit une deuxième centrifugation. Ce nouveau surnageant est récupéré dans un pot stérile de 100 mL.

Pour les pommes Bio (Figure 30 et Tableau XVI), dans le cas d'une inoculation de 0,1 mL, la pente du diagramme de dispersion est de 1,01 alors que pour un ensemencement de 1 mL elle est de 1,13. Dans les 2 cas, les coefficients de corrélations R^2 sont très proches (respectivement pour 0,1 et 1 mL $R^2 = 0,97$ et $R^2 = 0,97$). L'ordonnée, à l'origine pour 1 mL ($b = 0,26$), est plus élevée que pour 0,1 mL ($b = 0,01$). Les valeurs montrent qu'il y a une meilleure corrélation pour les faibles volumes ensemencés.

Pour les pommes Conventionnelles, nous observons une différence dans les pentes et les coefficients de régression selon les volumes inoculés. La pente est de proche de 1 pour 1 mL et n'est que 0,85 pour 0,1 mL. En ce qui concerne R^2 , il est proche de 1 pour 0,1 mL (0,95) alors qu'il est de 0,84 pour 1 mL. Les R^2 sont plus faibles que 1 avec 0,92 pour 0,1 mL et 0,84 pour 1 mL. Dans le cas des pommes Conventionnelles, les résultats ne permettent pas de conclure étant donné l'effectif restreint.

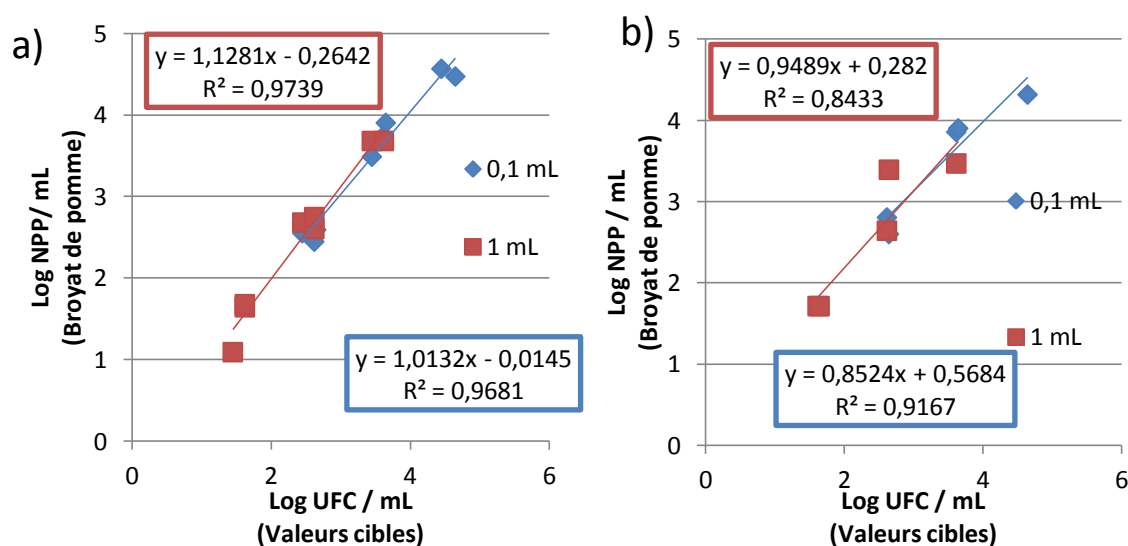


Figure 30 : étude de l'effet matrice des pommes Bio et Conventionnelles lors de dénombrements de suspensions d'*E. coli* (FAM ; carte Tempo® TVC et gélose PCA) diluées dans du broyat de Pommes Bio (a) et Pommes Conventionnelles (b)

Tableau XVI : valeurs caractérisant les droites de régression pour l'étude de l'effet matrice des pommes biologiques et conventionnelles avec la carte TVC

	Biologique			Conventionnelle		
	Pente	R ²	b	Pente	R ²	b
0,1 mL	1,01	0,97	0,01	0,85	0,92	0,57
1 mL	1,13	0,97	0,26	0,95	0,84	0,28

Les mêmes types d'étude ont été effectués sur les levures *S. cerevisiae* afin de déterminer s'il était possible de substituer la MdR avec la méthode alternative Tempo® YM.

1.1.2. Concordance des méthodes MdR versus Tempo® YM avec *S. cerevisiae*

Pour cette étude, nous avons utilisé les cartes Tempo® YM spécifique des levures / moisissures. Pour la MdR, nous avons utilisé le dénombrement sur milieu Sabouraud au chloramphénicol

D'après la Figure 31 et le Tableau XVII, les différences entre les moyennes obtenues par les 2 méthodes sont peu différentes pour les séries de 1 à 5.

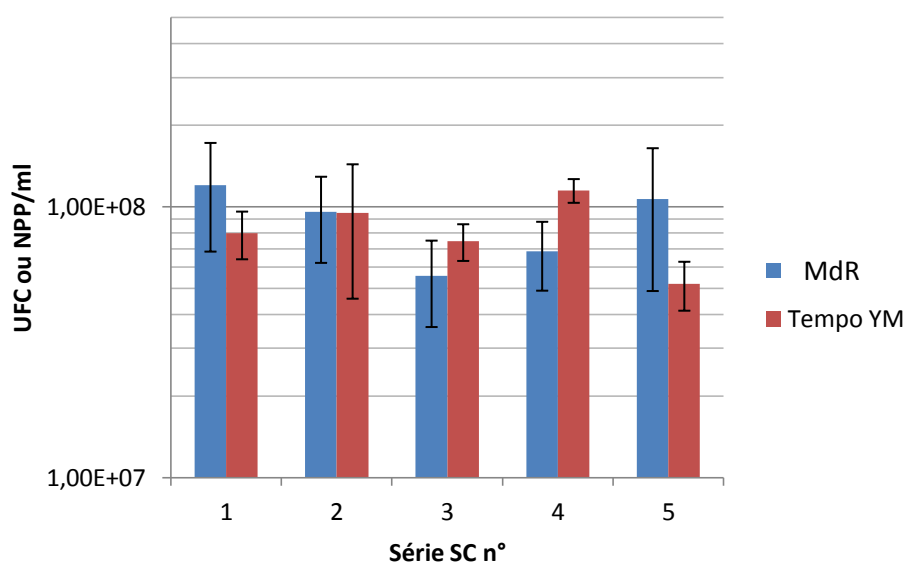


Figure 31 : dénombrement des suspensions de *S. cerevisiae* avec la MdR (Sabouraud au Chloramphénicol) et la méthode Tempo®, carte YM. n=4 ; Méthode Tempo® n = 3.

Tableau XVII : comparaison des concentrations moyennes et de leur valeur P obtenues pour *S. cerevisiae* avec la carte YM

Moyenne UFC ou NPP/mL ($\cdot 10^7$)			Test ANOVA		
Série	Référence	Alternative YM	Valeur F	Valeur p	Différence significative
1	12,0 \pm 5,2	8,0 \pm 1,6	1,068	0,336	
2	9,6 \pm 3,6	9,5 \pm 4,9	0,001	0,977	
3	5,6 \pm 2,0	7,5 \pm 1,2	2,519	0,157	
4	6,9 \pm 2,0	11,5 \pm 1,2	4,380	0,081	
5	11,7 \pm 5,8	5,2 \pm 1,1	1,594	0,247	

Légende : degré de signification ; p-value = 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < 1

La méthode Tempo® et la MdR donne des résultats de dénombrement similaires. La pente de la droite de régression est relativement proche de 1 avec $a = 0,968$ (Figure 32). La carte YM n'est pas certifiée Afnor mais est certifiée *Performance Tested Method*™ par AOAC Research Institute. Contrairement aux cartes TVC et TC, Biomérieux n'a pas communiqué les résultats concernant les caractéristiques de la droite de régression. Le diagramme de différence montre un biais $\hat{\delta}$ égal à -0,022, relativement proche de 0. Les valeurs seuils de concordance haute et basse sont respectivement de 0,39 et -0,43 ($\hat{\delta} \pm 1,96$ ET). Ces résultats attestent d'une très bonne concordance entre les 2 méthodes.

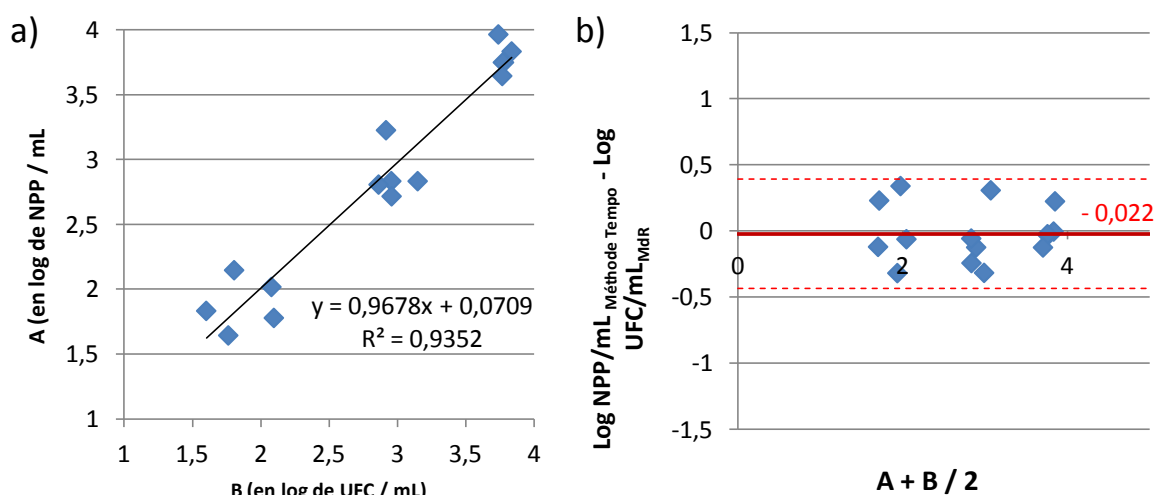


Figure 32 : comparaison de la méthode Tempo® et de la MdR dans le cas de dénombrements de *S. cerevisiae* avec les cartes YM : a) diagramme de dispersion ; b) diagramme de différences

La validation de la méthode Tempo® obtenue sur des cultures pures doit être étendue à nos matrices naturelles (épiderme de pommes) et à une flore indigène, complexe de par sa diversité et de leurs proportions.

1.1.3. Effet de la matrice pomme sur le dénombrement de la souche de référence *S. cerevisiae* (carte Tempo® YM)

Les a et b présentent les résultats obtenus avec *S. cerevisiae* sur les matrices Bio et les Figure 33c et d ceux des matrices Conventionnelles. Le mode opératoire est similaire à *E. coli* (voir précédemment).

D'après ses résultats (Figure 33 et Tableau XVIII), la matrice n'influence pas les résultats de dénombrement de la méthode Tempo®.

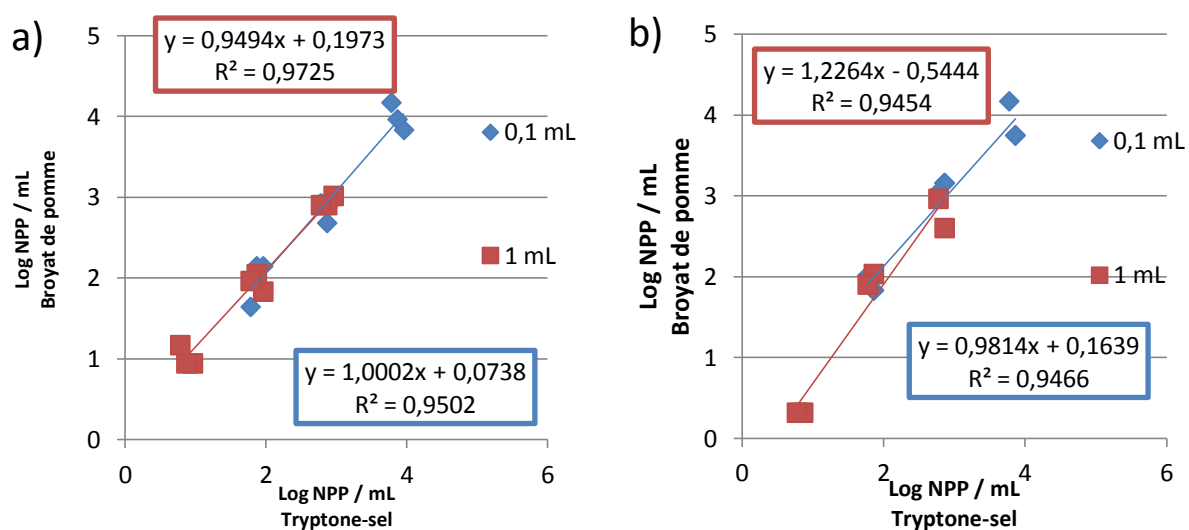


Figure 33 : étude de l'effet matrice des pommes Bio et Conventionnelles sur le dénombrement de suspensions de *S. cerevisiae* (Levures / Moisissures ; carte Tempo® YM et gélose Sabouraud au chloramphénicol) diluées dans du broyat de Pommes Bio (a) et Pommes Conventionnelles (b)

Tableau XVIII : valeurs caractérisant les droites de régression pour l'étude l'effet matrice des pommes Bio et Conventionnelles avec la carte YM

	Biologique			Conventionnelle		
	Pente	R ²	b	Pente	R ²	b
0,1 mL	1,00	0,95	0,07	0,98	0,95	0,16
1 mL	0,95	0,97	0,20	1,22	0,95	0,54

Ces différents résultats nous permettent de conclure que la matrice pomme n'influence pas le dénombrement. Il est possible d'utiliser indifféremment les dilutions 0,1 mL et 1 mL si on émet l'hypothèse que ces conclusions sont applicables aux flores naturelles des pommes.

1.2. Mise au point de la méthode d'extraction des microorganismes

Pour le dénombrement des flores indigènes, les mises au point de la méthode d'extraction des microorganismes de l'épiderme de pomme ont été réalisées sur des pommes Goldrush issus de l'agriculture biologique. On applique la méthode par homogénéisation et par sonication.

Les résultats du dénombrement, effectués sur les mêmes échantillons de pommes, permettent d'observer la désorption des microorganismes en fonction du temps et son intensité (Figure 34).

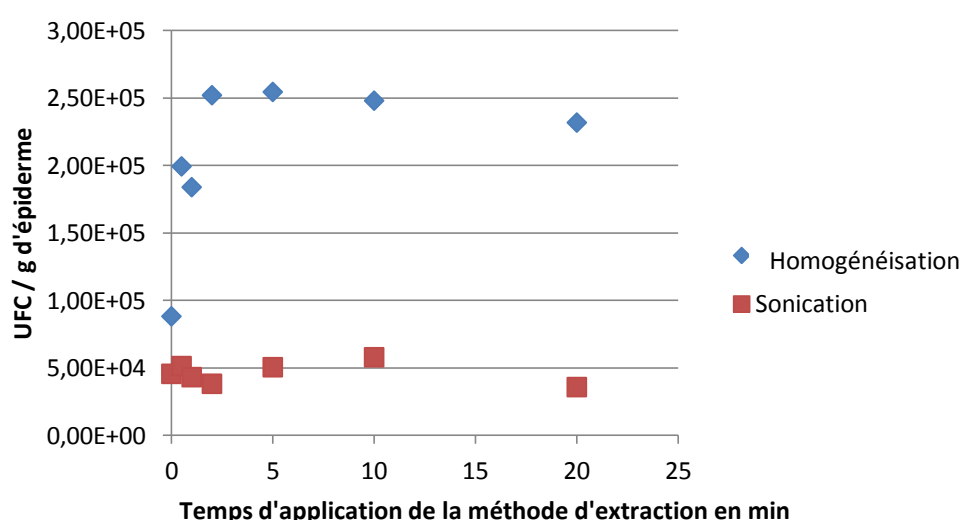


Figure 34 : cinétique de décrochage des microorganismes présents sur l'épiderme de pomme par homogénéisation et sonication

D'après la Figure 34, nous constatons que l'homogénéisation est la méthode la plus efficace pour le décrochage des microorganismes. Cette technique nous permet de décrocher une quantité maximale de $2,5 \cdot 10^5$ UFC par g d'épiderme au bout de 2 min. Nous avons retenu le temps de 2,5 min d'homogénéisation pour les essais.

1.3. Application des méthodes de dénombrement MdR et Tempo® à des flores naturelles de pommes

La technique de dénombrement en milieu solide sur gélose et les méthodes Tempo® sont comparées pour des dénombrements de flores **naturellement** présentes sur les pommes. 4 échantillons différents sont analysés : les pommes issues de l'agriculture Conventionnelle, Bio, Raisonnée et les pommes Non Traitées (III. 1.1.1 Choix de la variété et des parcelles).

Deux prélèvements de fruits ont été réalisés, le premier 7 jours avant la récolte (J-7) et ce avant le dernier traitement réalisé au verger (Annexe II). Le but de ce premier prélèvement était de réaliser

des essais préliminaires afin de valider le mode opératoire de ramassage et d'analyse. Le second a été effectué le jour de la récolte, défini par le producteur (J0), dans le but de récolter les échantillons nécessaires pour l'étude de conservation.

1.3.1. FAM naturelles des pommes

La Figure 35 présente les résultats de dénombrement obtenus sur les Non Traitées, Raisonnées, Bio et Conventiennelles. Nous remarquons que pour les Conventiennelles, Bio et Non Traitées, les résultats sont similaires pour les 2 méthodes. En revanche, les pommes Raisonnées possèdent des concentrations différentes de plus d'un log.

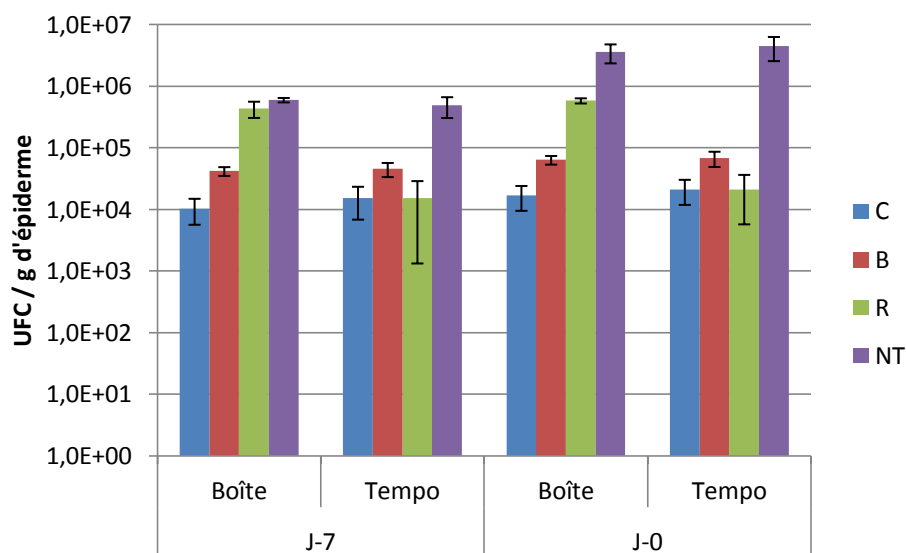


Figure 35 : résultats de dénombrement de la FAM pour les pommes Conventiennelles, Bio, Non Traitées et Raisonnées à J-7 et J-0 par la méthode Tempo® TVC et la MdR. (Non Traitées et Raisonnées : n=9 ; Bio et Conventiennelles : n=25)

La Figure 36 représente le rapport en pourcentage des résultats de dénombrement de la (Méthode Tempo® - MdR / MdR) x 100. Un résultat de 0 % signifie qu'il n'y a pas de différence entre les 2 méthodes.

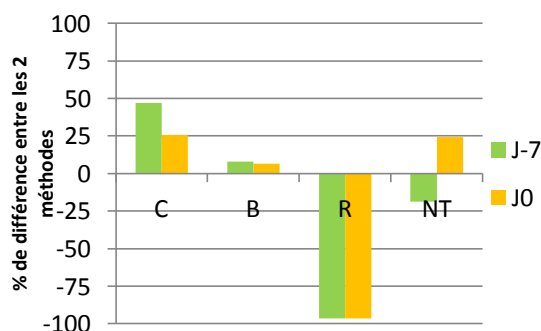


Figure 36 : histogramme de différences représentant en pourcentage le rapport des résultats de dénombrement de la FAM entre la méthode Tempo® et la MdR

D'après les résultats des dénombrements pour la FAM (Figure 36), pour les pommes issues des cultures Conventionnelles, Bio et Non Traitées sont du même ordre de grandeur quel que soit la méthode utilisée. Par contre, pour les Raisonnées, il est observé une différence notable d'environ 1 log de moins pour le Tempo® (soit 90 % de différences). La méthode Tempo® donne des résultats inférieurs çà ceux de la MdR. Il est possible que les pommes Raisonnées soient constituées de flores particulières. Nous avons donc réalisé une étude macroscopique des flores se développant sur les boîtes PCA. La Figure 37 montre des photos prises à partir des boîtes de dénombrements à J0.

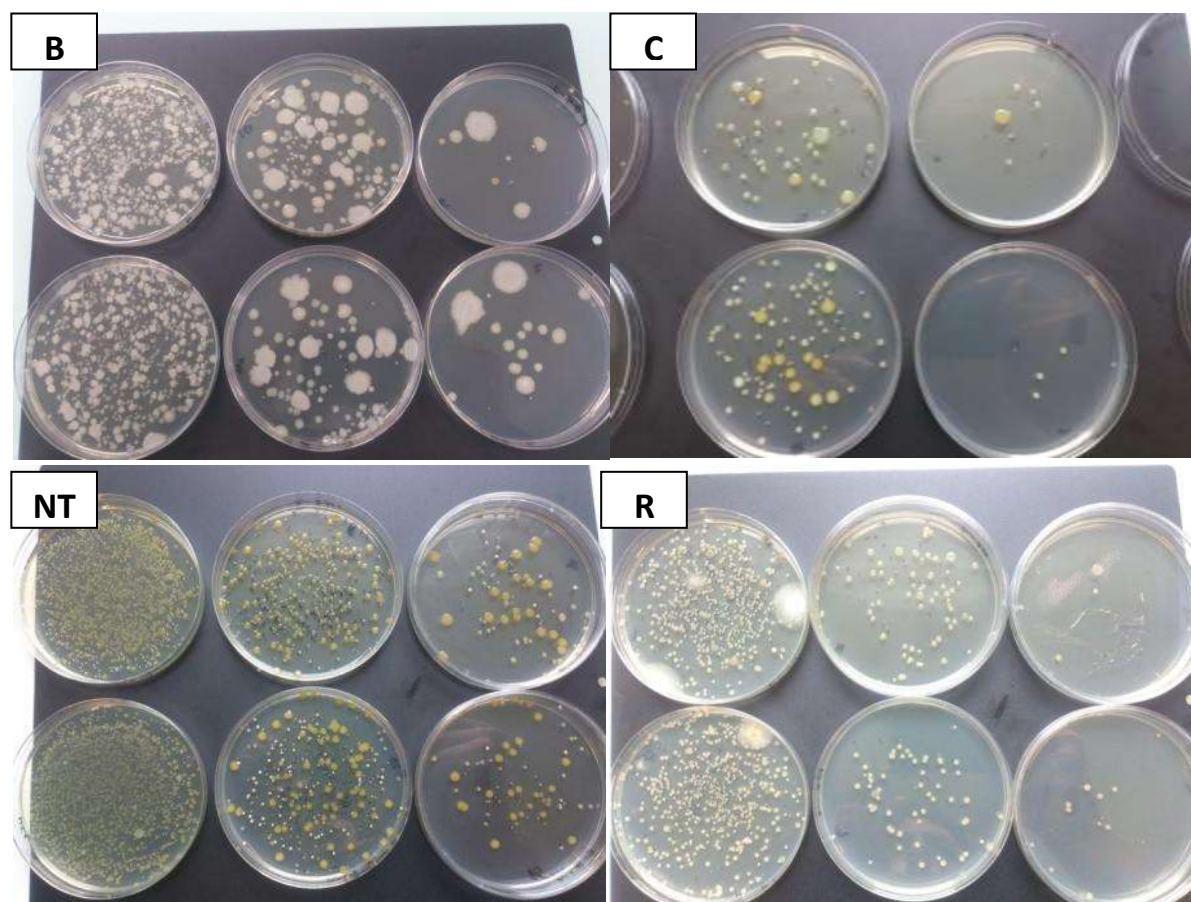


Figure 37 : Résultats obtenus avec la boîte de dénombrement sur 3 dilutions successives de 10 en 10 (de gauche à droite) à J-0 pour la FAM sur milieu PCA ; Pommes Bio (B), Conventionnelles (C), Non Traitées (NT) et Raisonnées (R)

D'après les photos, l'aspect macroscopique (taille, couleur, morphologie,...) ne montrent pas de différences majeures entre les flores présentes sur les Conventionnelles, Raisonnées et Non Traitées. Elles possèdent toutes des colonies pigmentées. En revanche, la culture Bio possède quasiment qu'un seul type de flore. Notons que ces résultats sont similaires à J-7 et à J0, c'est-à-dire avant et après le dernier traitement appliqué au verger.

Macroscopiquement, cette étude préliminaire sur les profils des colonies ne nous permet pas d'expliquer les différences de résultats pour les dénombrements entre la MdR et le Tempo® dans le cas des Raisonnées. Par contre, il se peut que ces différences soient dues aux techniques de dénombrement qui font appel à des modes de croissance et de révélations différents. L'une est basée sur le comptage de colonies alors que l'autre utilise une révélation par présence ou non de

fluorescence, dépendante d'activités enzymatiques microbiennes. Aussi, des éléments présents dans la matrice de la pomme peuvent éventuellement inhiber l'activité de ces enzymes et biaiser les résultats.

1.3.2. Levures et moisissures naturelles des pommes

Pour les levures / moisissures, la même démarche expérimentale que pour la FAM a été réalisée (Figure 38). Pour les pommes Conventionnelles et Non Traitées, ces résultats sont similaires entre la méthode Tempo® YM et les MdR (Sabouraud au chloramphénicol). En revanche, et comme observé pour la FAM des pommes Raisonnées, les fruits Raisonnés et Bio présentent des différences de résultats entre Tempo® et MdR avec 1 log pour les Bio et quasiment 2 logs pour les Raisonnées.

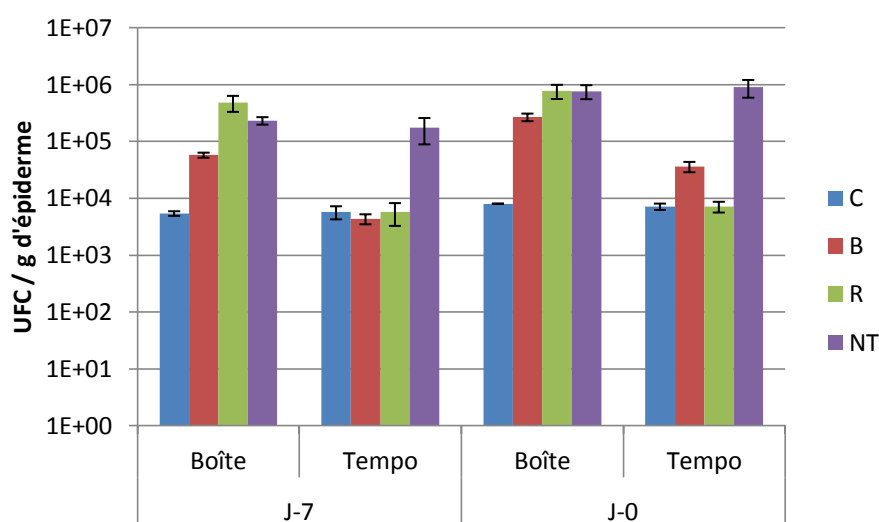


Figure 38 : résultats de dénombrement des levures / moisissures pour les pommes Conventionnelles, Bio, Non Traitées et Raisonnées à J-7 et J-0 par la méthode Tempo® et la MdR. (Non Traitées et Raisonnées : n=9 ; Bio et Conventionnelles : n=25)

La Figure 39 fait état des différences qu'il peut y avoir entre les deux méthodes pour les flores naturellement présentes. Elle représente le rapport (en pourcentage) des résultats de dénombrement de la (Méthode Tempo® - MdR / MdR) x 100.

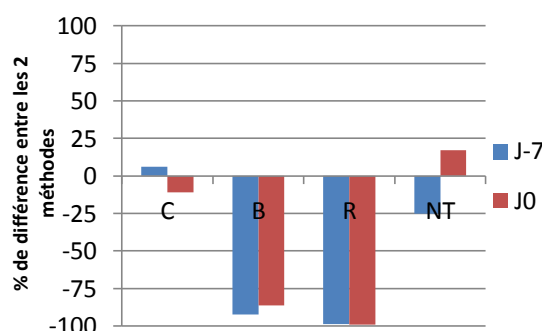


Figure 39 : histogramme de différences représentant en pourcentage le rapport des résultats de dénombrement des Levures/moisissures entre la méthode Tempo® YM et la MdR (Sabouraud au chloramphénicol)

Comme pour la FAM, les résultats de dénombrement de la flore fongique des pommes Conventionnelles et Non Traitées sont similaires avec les deux méthodes. En revanche, en comparaison avec la MdR, les résultats du Tempo® sont inférieurs d'un log pour les pommes Bio et quasiment 2 log dans le cas des pommes Raisonnées.

Les raisons de ces importantes différences peuvent avoir les mêmes causes qu'évoquées précédemment pour la FAM. En ce qui concerne la révélation des cartes YM, le principe est basé sur une réaction d'oxydoréduction réalisée par une nitro-réductase. La molécule oxydée, analogue de substrat fluorogène, devient alors fluorescente. Des éléments présents dans la matrice de la pomme peuvent comme dans la carte TVC inhiber l'activité de l'enzyme.

D'après la Figure 40, l'aspect des colonies ne permet pas de différencier les flores présentes sur les Conventionnelles, Raisonnées et Non Traitées. Elles possèdent toutes des colonies rondes assimilables à des levures. Les pommes Bio possèdent une part plus importante de moisissures par rapport aux autres modes de culture. Il n'est pas possible d'expliquer avec certitudes les différences de dénombrement pour les Bio et Raisonnées entre la méthode Tempo® et la MdR à partir de ces données. Notons que les résultats sont similaires à J-7 et J0.

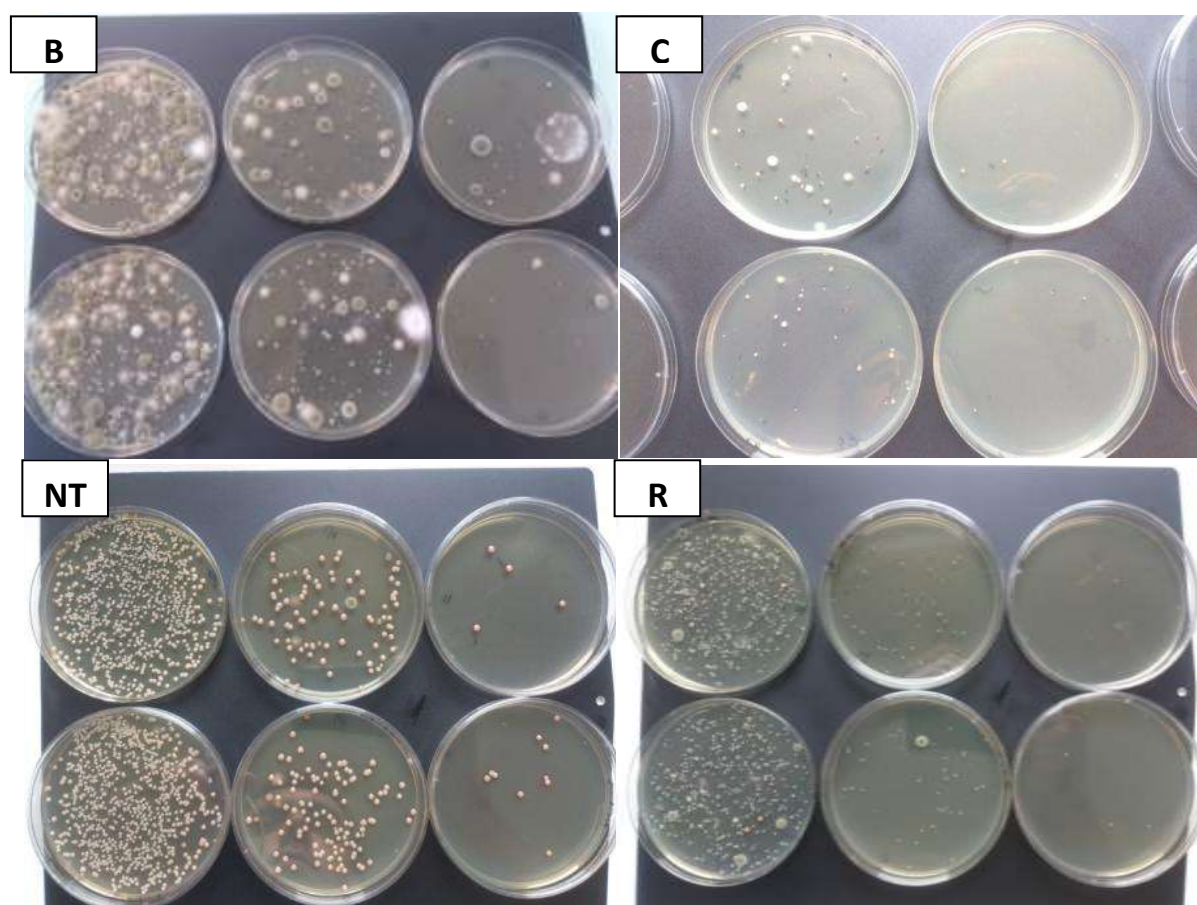


Figure 40 : Résultats obtenus avec la boîte de dénombrement sur 3 dilutions successives de 10 en 10 (de gauche à droite) à J-0 pour les levures et moisissures sur milieu Sabouraud au chloramphénicol ; Pommes Bio, Conventionnelles, Non Traitées et Raisonnées

Pour la FAM, nous avons vu ici que les résultats de dénombrement par les 2 méthodes Tempo® et MdR possèdent des résultats similaires pour les pommes Conventionnelles, Bio et Non Traitées (carte TVC), les Conventionnelles et Non Traitées pour les levures / moisissures (carte YM). Nous avons émis des hypothèses concernant les différences rencontrées pour les Raisonnées pour la FAM et les Raisonnées et Bio pour les levures / moisissures. Ces différences pourraient venir de :

- La composition du milieu adaptée de façons différentes selon le microorganisme
- La présence d'une flore indigène particulière ne se développant pas dans le système de carte Tempo®

Ces hypothèses ne peuvent pas être vérifiées mais on notera que les résultats se distinguent par le même comportement que ce soit à J-7 ou à J-0. Cette piste nous donne un argument supplémentaire sur le fait que ces différences peuvent être dues à la composition de la flore naturellement présente sur le produit.

Néanmoins, la méthode Tempo® reste une méthode d'analyse de choix pour les analyses de routine. En effet, la rapidité de préparation, d'ensemencement des échantillons de lecture des résultats permettent le traitement d'un grand nombre de produits et ainsi de multiplier les conditions lors d'essais. Ces résultats nous mettent cependant en garde sur les précautions préalables qu'il faut prendre, notamment sur la compatibilité avec le système de carte Tempo® de la matrice et des microorganismes la composant.

Pour la suite de notre étude, la méthode Tempo® sera utilisée en routine pour le dénombrement des flores FAM et fongiques toujours en parallèle de la MdR pour l'étude des flores naturelles au cours du stockage.

2. Suivi des flores microbiennes au cours du stockage des fruits

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Choix de la variété de pomme et modes de culture

La pomme Golden Delicious a été choisie pour l'étude de suivis des flores microbiennes au cours du stockage des fruits. Bien qu'elle ne soit pas l'une des pommes les plus produites en agriculture biologique, elle reste néanmoins la pomme la plus produite en Europe. Ce fruit a un rendement moyen à l'hectare avec 60 tonnes / hectare pour le cultivateur biologique (Guibert, 2013) et 90 tonnes / hectare pour le cultivateur conventionnel (Drapé, 2013). Ces différences notables de production ne sont pas dues au mode d'agriculture mais à la méthode utilisée, le producteur Bio préférant n'arroser que si une sécheresse importante est détectée.

N.B. : sur l'année 2013, le verger biologique n'a été irrigué qu'une seule fois alors que le verger conventionnel l'a été systématiquement toutes les semaines.

Pour l'étude de conservation, nous nous sommes restreints aux pommes Bio et aux pommes Conventionnelles. Différentes raisons nous ont poussés à faire ce choix. Dans un premier temps, le producteur des vergers Raisonnés et Non Traités n'était pas en mesure de nous fournir un

échantillonnage suffisant. En effet, le Conservatoire Végétal d'Aquitaine n'a pas la vocation de produire pour le commerce mais de conserver les différentes espèces fruitières. De ce fait, leur verger ne se limite qu'à quelques arbres par espèce. La production de fruit est donc très faible et ne permet pas de recueillir suffisamment d'échantillons pour un suivi à long terme. De plus, nos installations étaient trop restreintes pour une étude de plus grande envergure, à savoir, 2,5 m³ réfrigérés avec filtration.

2.1.2. Conservation

Avant et pendant la conservation, des capteurs de température et d'hygrométrie étaient placés à l'intérieur des caissons afin d'effectuer des relevés durant toute l'étude. Ces résultats de suivis apparaissent en annexe (Annexe II : Figure 112 et Figure 113). Notons qu'un incident s'est produit au niveau du compresseur d'air fin décembre (période de congés). Le flux d'air a été stoppé durant un peu plus de 2 semaines, entraînant une saturation de l'humidité dans l'enceinte des caissons. Ceci n'a cependant pas eu d'influence sur la conservation des fruits ; aucun fruit n'a été abîmé et aucun condensat n'a été observé. Par ailleurs, pendant les 8 mois de conservation, une faible fraction de fruit s'est abîmée (< 5 % de l'effectif total), aussi bien pour les Conventionnelles que pour les Bio.

2.2. Caractérisation de la flore fongique aux vergers

Pour caractériser les flores présentes sur le fruit au verger, à J0, nous avons observé macroscopiquement les boîtes de dénombrement des flores fongiques afin de différencier les levures des moisissures. Dans un premier temps, 3 types de pommes ont été étudiés : les Raisonnées, les Non Traitées et les Conventionnelles (Figure 41). Les flores sont différentes d'un point de vue qualité et quantité. Les fruits Bio ne sont pas présents sur la figure car leur récolte a été plus tardive. En effet, les critères de maturation des fruits sont différents pour le producteur Biologique, notamment pour le degré d'amidon.

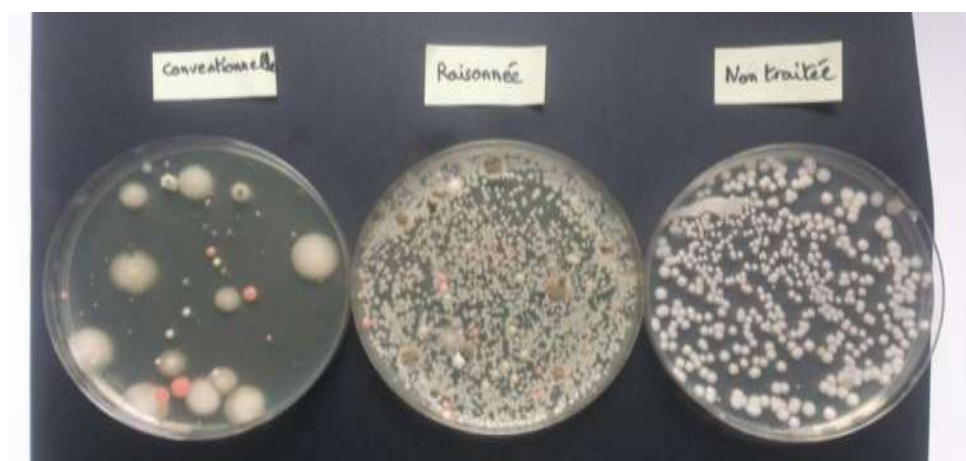


Figure 41 : résultat des boîtes de dénombrement des pommes Conventionnelles, Raisonnées et Non Traitées sur Sabouraud au chloramphénicol 5 jours après incubation à 25°C.
(Boîtes aux dilutions 10⁻²)

Les Raisonnées et Non Traitées sont plus chargées que les Conventionnelles avec un nombre plus élevé pour les Raisonnées. Les pommes Conventionnelles et Raisonnées présentent une diversité de flore avec des levures et des moisissures alors que les pommes non traitées ne semblent avoir qu'une flore uniquement constituée de levures.

Le comptage différencié des levures et moisissures a été effectué. Les pourcentages de moisissures sont faibles par rapport aux pourcentages de levures (Figure 42). Ces dernières sont très fortement majoritaires dans le cas des pommes Conventionnelles et Bio (moins de 20 % de moisissures) alors que pour les Raisonnées et Non Traitées, leur pourcentage est inférieur à 5 %.

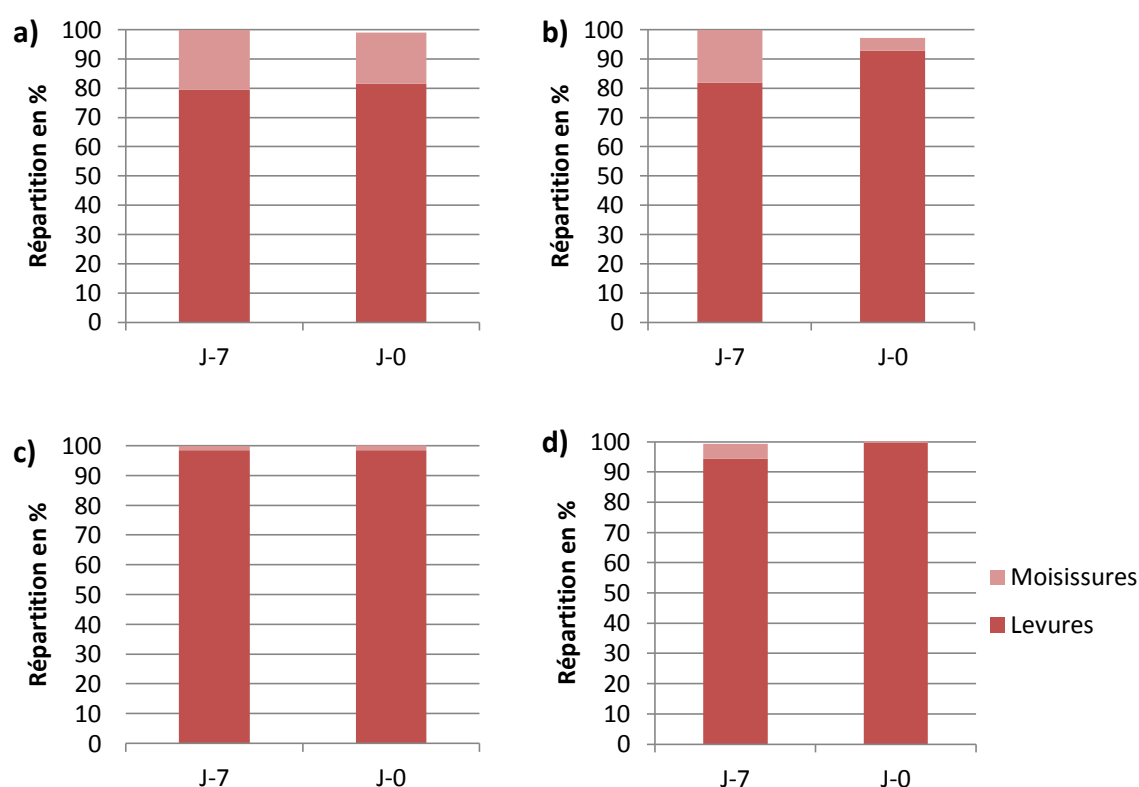


Figure 42 : répartition en pourcentage des levures/moisissures à J-7 et J0 lors d'un dénombrement sur milieu Sabouraud au chloramphénicol : a) Pommes Conventionnelles ; b) Pommes Bio ; c) Pommes Raisonnées ; d) Pommes Non Traitées

Bien qu'une étude macroscopique permette de différencier un certain nombre d'espèce, cette méthode a ses limites. Il n'était pas envisageable de réaliser une identification de chaque espèce se développant sur gélose par microscopie, la tâche étant fastidieuse, trop aléatoire et pas assez discriminante. Pour cela, nous avons opté pour l'identification par séquençage de l'ADN ; plus fine et permettant de traiter un plus gros volume d'échantillons biologiques (cf. IV.4.2. Identification par séquençage).

2.3. Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage

Le dénombrement des flores microbiennes des fruits Bio et Conventionnels ont été effectuées avec les méthodes de dénombrement Tempo® et MdR durant toute l'étude de conservation.

2.3.1. Suivi de la FAM

Les résultats des dénombrements aux différents temps de stockage sont présentés dans les Figure 43 et 57. En regard de l'évolution de la flore présente sur les Conventionnelles et Bio, une diminution apparaît dès le premier mois de stockage en chambre froide. Cette diminution ne semble évoluer que très légèrement jusqu'au 8^{ème} mois de stockage avec une perte de charge microbienne d'environ 95 % pour les 2 types de pommes (

Tableau XIX).

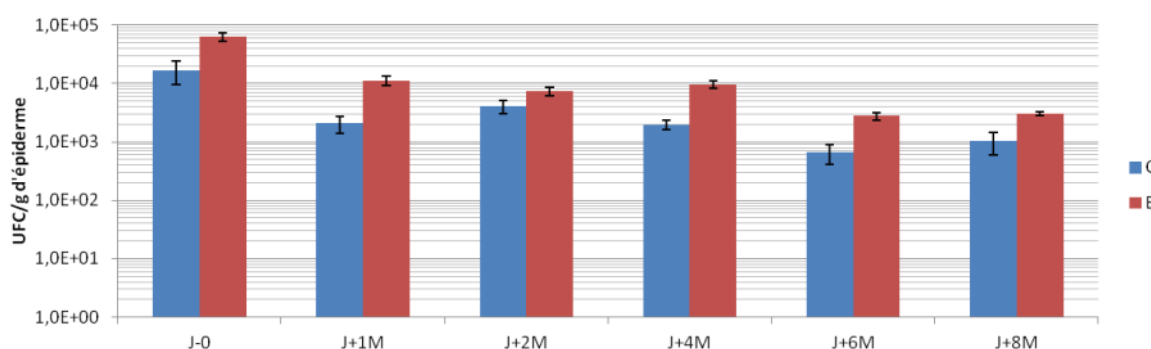


Figure 43 : évolution de la FAM pendant et après la récolte lors de dénombrement sur milieu gélosé PCA pour les pommes Bio et Conventionnelles. n=25 (p=0,05)

Tableau XIX : concentrations (en UFC / g ; MdR PCA) de la FAM présente sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage

Pommes	Avant stockage (J0)	Après 8 mois de stockage (J+8M)	Pourcentage de pertes
Bio	$6,4.10^4$	$3,1.10^3$	95,2
Conventionnelles	$1,7.10^4$	$1,0.10^3$	93,9

Les mêmes analyses ont été réalisées en parallèle avec le Tempo® (Figure 44). Les constats sur la diminution de flore au cours du temps de stockage sont les mêmes que pour le suivi par la méthode sur boîte. La diminution de flore au cours du stockage est de 95 % environ (Tableau XX), comme observé avec la MdR.

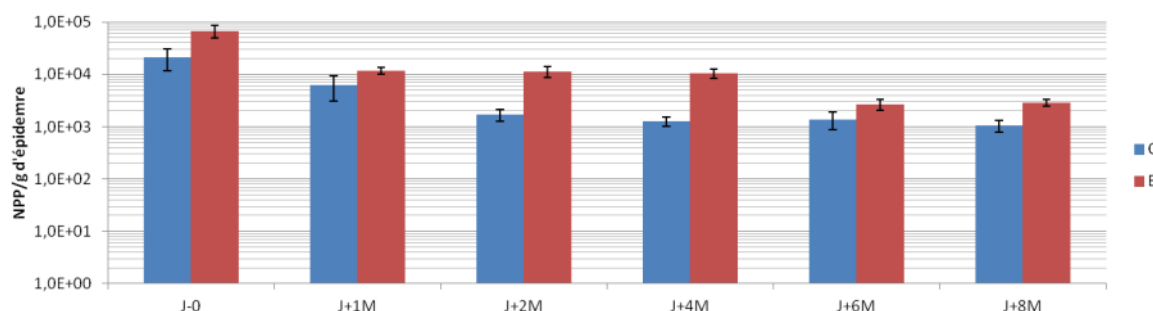


Figure 44 : évolution de la FAM avant, pendant et après la récolte lors de dénombrement par la méthode Tempo® TVC pour les pommes Bio et Conventionnelles. n=25 (p=0,05)

Tableau XX : concentrations (en NPP / g ; Tempo® TVC) de la FAM présente sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage

Pommes	Avant stockage (J0)	Après 8 mois de stockage (J+8M)	Pourcentage de perte
Bio	$6,8.10^4$	$3,0.10^3$	95,0
Conventionnelles	$2,1.10^4$	$1,1.10^3$	95,8

2.3.2. Suivi de la flore fongique

Les analyses ont également été réalisées pour le dénombrement des levures et des moisissures avec la MdR (Figure 45, 46 et 47). Sur les pommes Conventionnelles et Bio, une diminution supérieure à 1 log est constatée pour la flore des levures / moisissures après 8 mois de stockage, soit une diminution supérieure à 90 % (Tableau XXI). Pour les Conventionnelles, une augmentation de la flore semble être apparue à J+2M et J+4M, mais disparaît à J+6M.

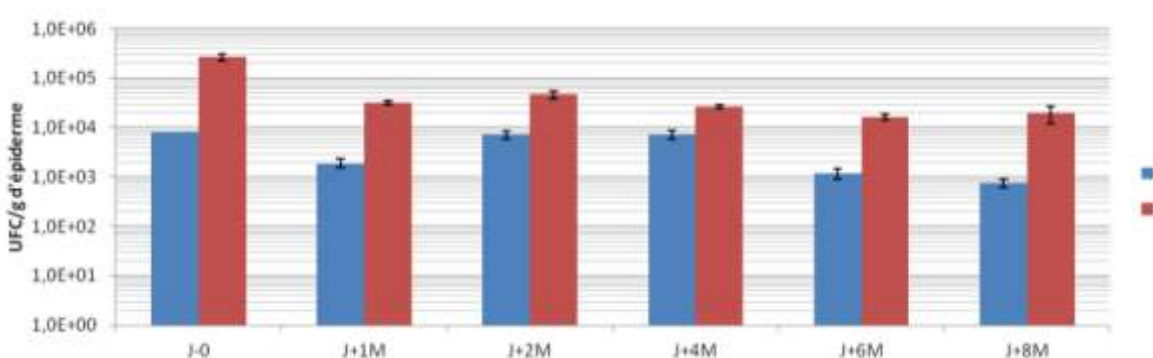


Figure 45 : évolution de la flore fongique avant, pendant et après la récolte lors de dénombrement sur milieu gélosé Sabouraud au chloramphénicol pour les pommes Bio et Conventionnelles. n=25 (p=0,05)

Tableau XXI : concentrations (en UFC / g ; MdR Sabouraud au chloramphénicol) des levures et des moisissures présentes sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage

Pommes	Avant stockage (J0)	Après 8 mois de stockage (J+8M)	Pourcentage de pertes
Bio	$2,7 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^4$	92,9
Conventionnelles	$8,0 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^2$	90,7

Les mêmes analyses ont été réalisées en parallèle avec le Tempo® (Figure 46). Avec la méthode Tempo® YM, le scénario d'évolution de la flore est similaire, avec une baisse d'un log pour les pommes Bio et quasiment de 2 pour les pommes Conventionnelles, soit respectivement 91,2 % et 98,8 % de pertes microbiennes (Tableau XXII).

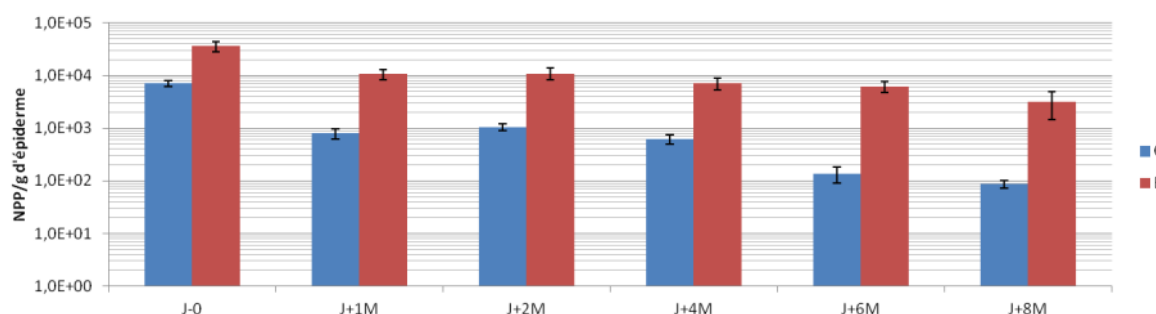


Figure 46 : évolution de la flore fongique pendant et après la récolte lors de dénombrement par la méthode Tempo® YM pour les pommes Conventionnelles et Bio, n=25, pour les Raisonnées et Non Traitées, n=9. (p=0,05)

Tableau XXII : concentrations (en NPP / g ; Tempo® YM) des levures et moisissures présentes sur les pommes Bio et Conventionnelles à J0 et J+8M ainsi que le pourcentage de perte après stockage

Pommes	Avant stockage (J0)	Après 8 mois de stockage (J+8M)	Pourcentage de pertes
Bio	$3,6 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^3$	91,2
Conventionnelles	$7,3 \cdot 10^3$	$8,6 \cdot 10^1$	98,8

Par ailleurs, les résultats de dénombrement entre la méthode sur milieu gélosé et la méthode Tempo® ne sont pas les mêmes. Avec cette dernière, nous avons obtenu des résultats de dénombrement plus faibles de quasiment 1 log, notamment pour les pommes Conventionnelles après 8 mois de stockage. Ce phénomène n'avait pas été observé lors de la comparaison de méthode pour J-7 et J-0 pour les Conventionnelles. Ceci pourrait être la résultante d'une sélection de flore par

le froid. Les raisons de ces différences pourraient être alors dues à une flore particulière se développant différemment en milieu liquide et milieu solide.

Les comptages différenciés des levures et des moisissures ont été effectués (Figure 47). La biocharge des Conventionnelles est plus faible que celle des Bio, autant pour les levures que pour les moisissures. Les différents lots de pommes sont plus chargés par des levures que par des moisissures d'environ 1 log, sauf pour les pommes Bio à J+8M. Au niveau des évolutions de flore au cours du temps, les populations de levures diminuent d'environ 1 log pour les Conventionnelles et les Bio après 8 mois de stockage. Pour les moisissures, nous retrouvons la même évolution. Nous noterons que pour les moisissures des pommes Bio à J+8M, les intervalles de confiance sont beaucoup plus élevés que pour le reste des analyses.

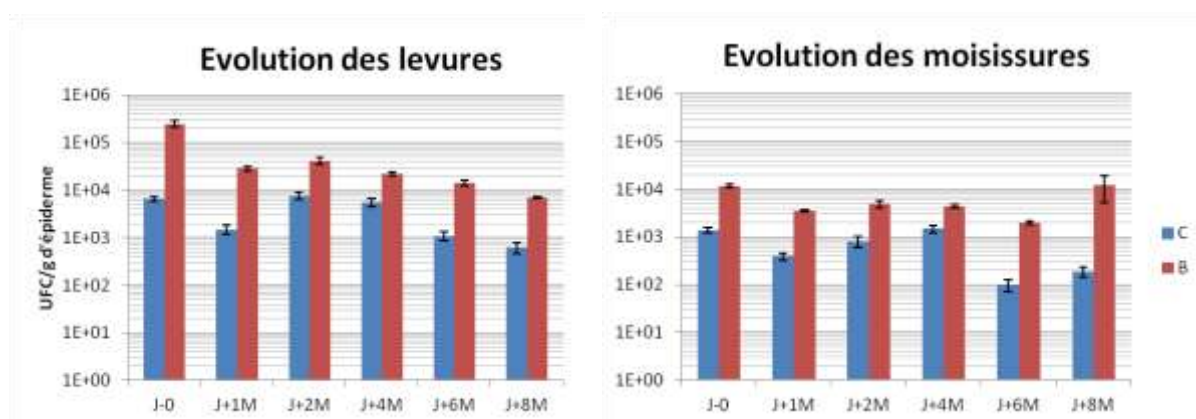


Figure 47 : évolution de la flore fongique levures et moisissures pendant et après la récolte observée par dénombrement sur gélose de Sabouraud au chloramphénicol. n=25 (p=0,05)

Les résultats de dénombrement de la flore au verger ont démontré que la composition des flores pouvait être différente selon la méthode culturale. Nous avons également vu que leurs quantités varient elles aussi avec des différences pouvant atteindre jusqu'à 2 logs, aussi bien pour la FAM que pour les levures et moisissures. Lors du stockage, les pommes Bio subissent une perte de FAM* et de levures/moisissures d'un logarithme après 1 mois en chambre froide quel que soit la méthode de dénombrement utilisées. Le nombre de microorganisme se stabilise durant le stockage. Pour les pommes Conventionnelles, le constat est similaire pour la FAM. En revanche, la tendance est légèrement différente pour les levures et moisissures. En effet, la diminution d'un log est également visible lors de l'entrée en chambre froide. Comme nous l'avons précédemment précisé, le dénombrement avec MdR et par la méthode Tempo® mettent en jeux deux compositions de milieu différentes ; un en milieu solide et l'autre en milieu liquide. Certains micro-organismes sont plus aptes à un développement planctonique alors que d'autres le sont plus pour un développement benthique (fixer à un support). Par conséquent, les résultats sont différents mais les tendances restent les mêmes pour un même type de pommes.

Par ailleurs, les diminutions après 1 mois en chambre froide peuvent être dues au changement brutal de température, celle-ci étant de 1°C environ. Ce froid, relativement intense et prolongé pour des organismes mésophiles, peut induire leur incapacité à reprendre leur multiplication. Une proportion de ces flores devient potentiellement viable non cultivable (VNC) ou bien, la mort

cellulaire est induite. Les organismes les moins adaptatifs sont victimes de cette rigueur. Une action lente et prolongée du traitement de conservation effectué au verger avant la récolte pourrait aussi en être la cause.

En ce qui concerne la diversité de ces flores, nous avons vu sur les photos (Figure 41) que dans certains cas, la diversité était importante (FAM des pommes Conventionnelles) alors qu'au contraire, dans d'autres, une seule flore majoritaire subsistait (FAM des pommes Bio) (Figure 41). Ce genre de phénomène pourrait être en partie dû à une compétition entre les micro-organismes.

Afin de mieux comprendre et connaître les espèces présentes sur la pomme au verger et lors du stockage, des identifications par séquençage génétique ont été réalisées (cf. IV.4.2. Identification par séquençage).

** on notera que les levures et les moisissures font partie de la flore aérobie mésophile. C'est pour cela qu'une étude a été réalisée (cf. IV.B.4.b. Flore bactérienne).*

2.4. Etude des flores psychrophiles et bactériennes

2.4.1. Flores psychrophiles

Dans cette expérience, nous avons cherché à évaluer la proportion de microorganismes psychrophiles de la FAM et des levures / moisissures (sur PCA) pouvant se développer en inoculant des géloses que l'on incube à 10 °C pendant 10 jours. Ainsi, le développement de ces flores est favorisé vis-à-vis des flores mésophiles. Les résultats des dénombrements à J0 sont présentés en Figure 48.

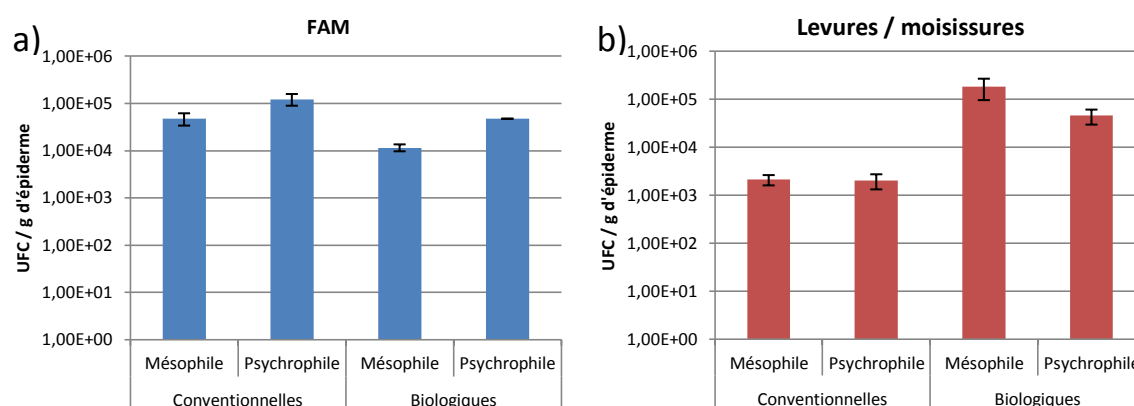


Figure 48 : dénombrement de la FAM et de la flore psychrophile (10 jours ; 10 °C) (a) et pour les levures et moisissures (b) pour les pommes Conventionnelles et Bio

Très peu de différences entre les flores mésophile et psychrophile sont visibles sur les histogrammes. Une étude macroscopique (Figure 49) a permis d'observer que les colonies se développant sur les géloses de PCA ou de Sabouraud au chloramphénicol possèdent les mêmes phénotypes morphologiques et colorés que ce soit pour une croissance en condition mésophile ou

psychrophile. La flore psychrophile est assimilable à la flore mésophile ; c'est donc une flore psychrotrophe.

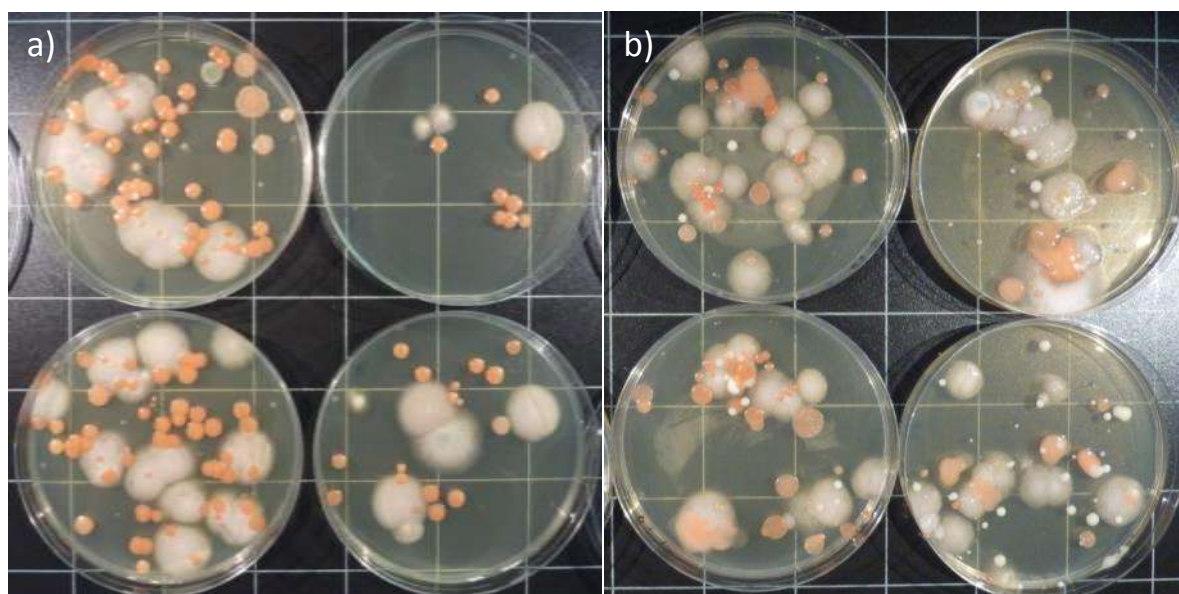


Figure 49 : boîte de dénombrement en condition mésophile (30 °C) (a) et en condition psychrophile (10 °C) (b) d'échantillon de pommes conventionnelles sur gélose Sabouraud au chloramphénicol.

2.4.2. Flore bactérienne

Pour l'étude de la flore bactérienne, des pommes Bio et Conventionnelles ont été dénombrées simultanément sur milieu PCA, PCA supplémenté en cycloheximide et Sabouraud au chloramphénicol. La gélose PCA supplémentée avec 25 mg / L de cycloheximide sélectionne spécifiquement les bactéries, permettant ainsi de faire le ratio entre une gélose PCA et une gélose PCA supplémentée.

Peu de différences ont été observées entre les dénombrements effectués sur gélose PCA et sur gélose PCA supplémentée à la cycloheximide (données non montrées). La majorité des espèces poussant sur ce milieu complet sont donc des bactéries. Les hypothèses pouvant l'expliquer seraient, soit que les champignons (surtout les levures) se développent plus lentement que les bactéries, qui occupent rapidement l'espace ; soit que le temps d'incubations est trop court ; soit qu'ils ne peuvent pas pousser sur PCA. On notera cependant que pour les pommes Bio, une espèce bactérienne très fortement majoritaire est présente. Aussi, les concentrations fongiques sur l'épiderme sont supérieures aux concentrations bactériennes avec respectivement $5,3 \cdot 10^4$ UFC / g d'épiderme et $4,3 \cdot 10^5$ UFC / g d'épiderme, soit un ratio Bactéries / Champignons de 0,12 (= 10 fois plus de champignon que de bactérie).

Nous avons vu que les méthodes de dénombrement de microbiologie classique nous permettent d'obtenir de nombreuses données difficiles à analyser, tout d'abord, les quantités des dénombrements sur gélose et avec le système Tempo®, miniaturisation de la méthode NPP. Ensuite,

nous avons obtenu des informations sur les types de flore avec les milieux sélectifs commerciaux ou interne au laboratoire (supplément en cycloheximide), et le panel de cartes disponibles pour le Tempo®. Cependant, ces techniques de dénombrement sont culture-dépendantes. Seuls les microorganismes viables et cultivables peuvent être étudiés par ces techniques alors que leur part est largement minoritaire (Roszak *et al.*, 1987). De plus, les temps d'incubation peuvent être assez long (plusieurs jours) ce qui retardent les résultats.

Pour pallier à ces problèmes, la biologie moléculaire a fait de grandes avancées ces dernières décennies. La mise au point de techniques toujours plus innovantes et rapides ne cessent de voir le jour. Par ailleurs, les principaux microorganismes de dégradation lors de la conservation et la transformation des fruits et légumes sont les champignons. Dans cette optique, nous avons tenté de développer une technique de dénombrement par PCR en temps réel spécifique du règne des champignons.

3. Développement d'une méthode de dénombrement par PCR en temps réel

3.1. Méthode d'extraction

Pour réaliser des analyses en biologie moléculaire, l'extraction et la purification de l'ADN sont indispensables. Pour cela, une méthode d'extraction adaptée à notre application a été mise au point. Elle se devait d'être la plus efficace et avoir le meilleur rendement possible tout en conservant au maximum l'intégrité du matériel génétique. Pour ce faire, plusieurs étapes de mise au point ont été nécessaires :

- Le choix de « microorganismes tests » adaptés à notre application
- Le choix d'un kit d'extraction
- L'optimisation de celui-ci

3.1.1. Choix de microorganismes tests

D'après les connaissances acquises à ce stade de l'étude (IV. 2. Suivi des flores microbiennes au cours du stockage des fruits) et en tenant compte de la bibliographie (cf. II.2.2. Microbiologie du fruit), les microorganismes présents sur la pomme sont de plusieurs natures. On y retrouve notamment des bactéries de types *Bacillus* ; principalement sur les pommes provenant de l'agriculture biologique, des champignons de type levure et des moisissures en plus faibles proportion.

La réussite d'une extraction d'ADN réside d'une part dans la capacité à casser les parois cellulaires afin d'en extraire le contenu génétique. D'autre part, il est primordial de récupérer avec la plus grande efficacité des molécules d'ADN de qualité. Hors, parmi les espèces présentes sur le fruit, certaines ont la capacité d'être sous forme de résistance. C'est le cas des *Bacillus* mais également des moisissures. Cette forme de résistance est appelée « spore ». Particulièrement robuste, elle permet à la cellule de survivre à des conditions difficiles (Prieur *et al.*, 2011). C'est le cas sur le fruit où, la cellule accrochée à l'épiderme est soumise aux conditions extérieures : faible hygrométrie,

rayonnements solaire (dont les UV) et faibles quantités de nutriments. Toutes les cellules se trouvant à la surface du fruit ne sont pas sous cette forme, mais la technique d'extraction doit aussi être adaptée aux microorganismes les plus résistants ; les spores.

Pour cela que nous avons fait le choix de plusieurs types de microorganismes :

- 2 bactéries : *E. coli* et *B. subtilis*, bactéries modèles de laboratoire
- 1 levure : *S. cerevisiae*, levure modèle de laboratoire
- 2 moisissures : *A. niger* et *F. graminearum*, elles sont retrouvées chez de nombreux végétaux (Lund *et al.*, 2000)

On notera que ces microorganismes ont des capacités de croissance rapide, ce qui permet d'obtenir une bonne quantité de biomasse en peu de temps, facilitant ainsi la démarche expérimentale de mise au point.

3.1.2. Choix du kit d'extraction

Les méthodes d'extraction au phénol-chloroforme, dont l'efficacité n'est plus à prouver, sont très longues à mettre en œuvre et non compatibles avec un flux important d'échantillon comme dans notre cas. Donc, dès le début, le choix de kit commerciaux d'extraction et de purification a été fait.

Les kits commerciaux avec purification se présentent sous la forme d'un ensemble de solvants et solutions pour l'extraction couplé à l'utilisation de colonnes contenant des résines de silices pour la purification. Une très grande variété de kit existe en fonction de l'application. Celui correspondant le plus à notre application est le Kit NucleoSpin Soil (Macherey Nagel, USA), car adapté aux échantillons contenant des espèces microbiennes particulièrement résistantes aux conditions difficiles (sous forme sporulée). En effet, il possède des solvants de lyse pour une extraction chimique mais aussi des billes de céramiques permettant une action mécanique pour casser les échantillons et endommager la paroi des organismes. Ce kit avait déjà été sélectionné dans mon laboratoire d'accueil à Bordeaux (LMBA) pour son efficacité lors de l'extraction d'ADN d'écosystèmes complexes comme le microbiote intestinal (Carasi *et al.*, 2015b). D'ailleurs, Marques Martins et ses collaborateurs (Marques Martins, 2012) ont eux aussi opté pour un kit d'extraction de même nature pour leurs études sur l'écologie microbienne de la baie de raison. De même, l'équipe de (Borneman and Hartin, 2000) a fait ce choix pour l'étude des champignons environnementaux.

Le kit NucleoSpin Soil a donc été expérimenté par la suite sur les microorganismes tests sélectionnés.

3.1.3. Optimisation du protocole d'extraction

L'extraction de l'ADN d'après les recommandations de Macherey Nagel se déroule en 10 étapes successives comme présenté dans la Figure 50. On notera 2 modifications inhérentes à la nature des matrices utilisées et au matériel de laboratoire :

- La quantité de matrice introduite (étape 1) à l'intérieur des tubes de billes n'est pas un poids quand il s'agit d'échantillon liquide mais un volume de broyat. Celui-ci a été de 200 µL.
- La lyse des échantillons ne sera pas effectuée avec un vortex horizontal mais avec un Ribolyser (Hybaid, USA). Les paramètres sont fixés par défaut à 30 sec, puissance 4,5.

N.B. : chacune des 2 modifications a été testée et validée dans un protocole de routine interne au laboratoire.









1	Prepare sample		NucleoSpin® Bead Tube 250–500 mg sample material 700 µL SL1 or SL2												
2	Adjust lysis conditions		150 µL Enhancer SX												
3	Sample lysis		Horizontally vortex 5 min at RT or use other homogenizers according to manufacturers protocol												
4	Precipitate contaminants		11,000 x g, 2 min 150 µL SL3 Vortex 5 s 0–4 °C, 5 min 11,000 x g, 1 min												
5	Filter lysate		Load supernatant on NucleoSpin® Inhibitor Removal Column (red ring) 11,000 x g, 1 min												
6	Adjust binding conditions		250 µL SB Vortex 5 s												
7	Bind DNA		Load 550 µL sample on NucleoSpin® Soil Column (green ring) 11,000 x g, 1 min Load remaining sample 11,000 x g, 1 min												
8	Wash silica membrane		<table><tr><td>1st</td><td>500 µL SB</td><td>11,000 x g, 30 s</td></tr><tr><td>2nd</td><td>550 µL SW1</td><td>11,000 x g, 30 s</td></tr><tr><td>3rd</td><td>700 µL SW2 Vortex 2 s</td><td>11,000 x g, 30 s</td></tr><tr><td>4th</td><td>700 µL SW2 Vortex 2 s</td><td>11,000 x g, 30 s</td></tr></table>	1st	500 µL SB	11,000 x g, 30 s	2nd	550 µL SW1	11,000 x g, 30 s	3rd	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s	4th	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s
1st	500 µL SB	11,000 x g, 30 s													
2nd	550 µL SW1	11,000 x g, 30 s													
3rd	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s													
4th	700 µL SW2 Vortex 2 s	11,000 x g, 30 s													
9	Dry silica membrane		11,000 x g, 2 min												
10	Elute DNA		30–100 µL SE RT, 1 min 11,000 x g, 30 s												

Figure 50 : schéma du protocole original du kit NucleoSpin Soil

Pour évaluer la qualité et quantité d'ADN, il convient de déposer sur gel d'agarose un aliquot d'extrait ainsi que d'effectuer un dosage au NanoDrop.

Des essais d'extraction ont dans un premier temps été réalisés en respectant le protocole commercial de Macherey Nagel sur les différents espèces de microorganismes « Test ». Les résultats ont été positifs pour les levures *S. cerevisiae* et bactéries GRAM (-) *E. coli*. Ils ont par contre été négatifs pour l'extraction sur mycélium de *F. graminearum* et sur les spores d'*A. niger* et quasi nul pour *B. subtilis* (GRAM (+)). Compte-tenu de ces résultats négatifs, le protocole a dû être adapté en ajoutant des étapes et en modifiant certains paramètres.

C'est donc dans un second temps qu'ont été testées différentes extractions avec plusieurs modifications et combinaisons.

- Pour l'extraction sur les bactéries, le lysozyme a été ajouté dans une étape préliminaire à l'extraction. Cet enzyme agit en dégradant le peptidoglycane des parois bactériennes en hydrolysant les liaisons glycosidique. Il est particulièrement efficace sur les bactéries GRAM (+) comme *B. subtilis*. En revanche, il est moins actif sur les bactéries GRAM (-) car celles-ci possèdent une membrane externe et une couche de lipopolysaccharides qui empêche le lysozyme d'accéder au peptidoglycane.
- Pour l'extraction sur les champignons, la lyticase a été ajoutée dans une étape préliminaire à l'extraction. Son action glucanase détruit les glucanes présent dans la paroi des champignons. Principalement utilisé dans la destruction des parois cellulaires de levures (Scott and Schekman, 1980), elle est également utilisée pour détruire les parois des moisissures (Griffiths *et al.*, 2006).
- Un enzyme, la protéinase K a également été testée. Cette protéine à activité endopeptidase est beaucoup utilisée en biologie moléculaire pour éliminer les contaminants de préparation comme les DNases et les RNases. Elle dégrade également certaines protéines des parois cellulaires mais également celles responsables de l'enroulement de l'ADN.

Précédemment, nous avons vu que les problèmes rencontrés lors de l'extraction provenaient surtout des champignons. Les résultats présentés ci-après détailleront la mise au point du protocole pour les champignons *F. graminearum* et *A. niger*.

Nous avons réalisé différentes conditions d'extraction sur du mycélium de *F. graminearum*. Le Tableau XXIII présente les résultats d'extraction par dosage au NanoDrop sur le mycélium. Le rapport, quantité d'ADN extrait (ng / μ l) sur la masse de mycélium introduit (en mg) nous a permis de comparer les rendements d'extraction (Tableau XXIII). La Figure 51 montre une photo du gel après extraction. Elle permet d'observer la qualité de l'ADN afin de savoir si celui-ci n'est pas trop dégradé.

D'après le tableau et la photo de gel, la lyticase a un effet positif sur l'extraction en augmentant le rapport de rendement. La protéinase K l'améliore également (2 et 4). Les meilleurs résultats

d'extraction sont obtenus avec le tampon de lyse SL2 du kit d'extraction Macherey Nagel (3). En revanche, les extractions 5 et 6 semblent avoir de bons rendements. Ces conditions 5 et 6 dégradent beaucoup les ADN. Ces derniers sont très dégradés avec une absence de bande majoritaire en haut des pistes (pas de hautes masses moléculaires). Les billes 0,1 mm ou les billes MP (Lysing Matrix MP Biomedicals, USA) ne conviennent pas à l'extraction de l'ADN de mycélium (5) car elles dégradent trop le matériel génétique.

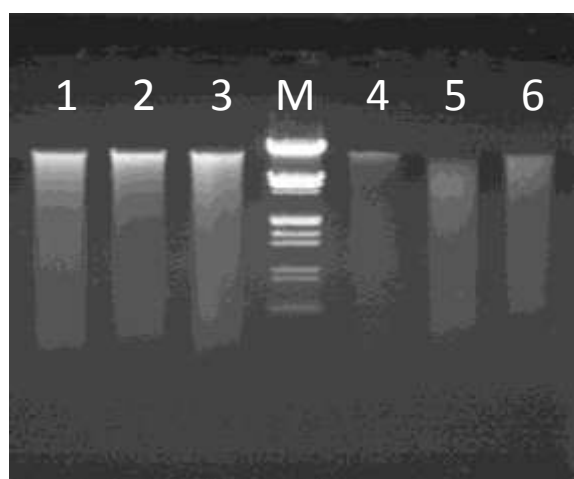
Tableau XXIII : résultats d'extraction d'ADN sur mycélium de *F. graminearum* par dosage optique au NanoDrop.

		Poids mycélium (en mg)	Résultats NanoDrop (en ng/ μ l) *	Rapport (Quantité ADN (en ng / quantité matériel en mg)	
1	Lysozyme + prot. K ; kit MN	20,22	32,0	79,1	+
2	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN	20,24	36,7	90,7	++
3	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN avec Tampon SL2	15,49	43,1	139,1	+++
4	Lysozyme/Lyticase; kit MN	17,72	17,9	50,5	-
5	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN avec billes 1.0mm+0.1mm (50/50:v/v)	11,23	25,2	112,2	+++
6	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN avec billes kit MP	15,76	22,2	70,4	+

* Volume d'élution = 50 μ L

Concentration en enzyme :

Lysozyme : 30 mg/ml ; Lyticase : 300 UA/ml ; Protéinase K : 60 mUA/ml



1 : Lys. + Prot. K → kit MN
2 : Lys./Lyt. + Prot. K → kit MN
3 : Lys./Lyt. + Prot. K → kit MN SL2
4 : Lys./Lyt. → kit MN
5 : Lys./Lyt. + Prot. K → kit MN + Bille 0,1mm
6 : Lys./Lyt. + Prot. K → kit MN avec bille MP
M : Marqueur phage Lambda dig.
EcoRI/HindIII

Figure 51 : résultat d'extraction d'ADN de mycélium de *F. graminearum* ; gel d'agarose 1% avec dépôt de 5 μ l d'extrait d'ADN par les 6 conditions ci-dessus.

A ce stade, ces différents constats permettent d'orienter notre choix vers la méthode d'extraction (3) pour l'extraction de mycélium de *F. graminearum*. Cependant, nous avons dû également tester différents protocoles d'extraction sur spores d'*A. niger*. Afin d'estimer l'efficacité des rendements d'extraction, deux méthodes de calculs ont été utilisées. La première est le rapport « quantité d'ADN extraite / quantité de matériel », comme vu précédemment. La seconde méthode consiste à dénombrer le nombre de spores germées avant et après l'extraction. Il est alors possible d'estimer le nombre de spores potentiellement détruites ayant libéré leur contenu génétique. Les résultats sont montrés dans le Tableau XXIV, le Tableau XXV ainsi que la Figure 52.

Tableau XXIV : résultats d'extraction d'ADN sur spore d'*A. niger* par dosage optique au NanoDrop.

		Poids de spore (en mg)	Résultats NanoDrop (en ng/μl)	Rapport (ng —— mg)	
A	Lyticase + prot. K ; kit MN	3,66	27,8	379,8	+
B	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN	3,08	24,1	391,2	+
C	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN <u>1</u> <u>seule</u> étape bille	2,9	33,9	584,5	++
D	Lysozyme/Lyticase + broyage avant étape Prot. K ; kit MN	3,25	54,8	843,1	+++
E	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN avec billes 1.0mm+0.1mm (50/50:v/v)	3,18	14,1	221,7	+
F	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN avec billes kit MP	2,77	34,8	628,2	++

*Estimation du nombre de spore d'*A. niger* par comptage sur cellule de Malassez

A partir de 2,78mg de spores, repris dans 1 ml de Tryptone-sel. Les spores étant hydrophile, elles sont soniquées 2 min au bain à ultrason pour défaire les agrégats

- Comptage sur cellule de Malassez : $5,12 \cdot 10^7$ UFC/ml soit $1,84 \cdot 10^7$ spores germées / mg de spores
- Comptage sur boîte : $4,9 \cdot 10^7$ UFC/ml soit $1,76 \cdot 10^7$ spores germées / mg de spores

Soit 1 mg de spore = $1,80 \cdot 10^7$ UFC potentielles

Tableau XXV : résultats d'extraction d'ADN sur spore d'*A. niger* par dosage optique au NanoDrop et dénombrement sur boîte.

		Poids de spore (en mg)	Résultats NanoDrop (en ng/μl)	Rapport (ng/ml) mg)	Estimation du nombre de spore*	Nombre de spores ⁽¹⁾ après traitement	Nombre de spores ⁽²⁾ après traitement
B	Lysozyme/Lyticase + Prot. K; kit MN	3,08	24,1	391,2	$6,5.10^7$	$1,3.10^5$ 0,2%	$8,8.10^6$ 13,5%
D	Lysozyme/Lyticase + Prot. K avec une broyage avant ; kit MN	3,25	54,8	843,1	$7,4.10^7$	$1,8.10^6$ 2,43%	$2,16.10^6$ 2,91%
O	Non traité	2,78			$5,12.10^7$	$4,9.10^7$	$5,12.10^7$

*Estimation du nombre de spore d'*A. niger* par comptage sur cellule de Malassez

⁽¹⁾ estimation après comptage sur cellule de Malassez : les spores bien rondes et stringentes à la lumière sont considérées comme « viables » alors que les déformées et/ou bleu (coloration au bleu de méthylène) sont considérées comme mortes

⁽²⁾ estimation après dépôt sur boîte (seules les spores germées seront visibles).

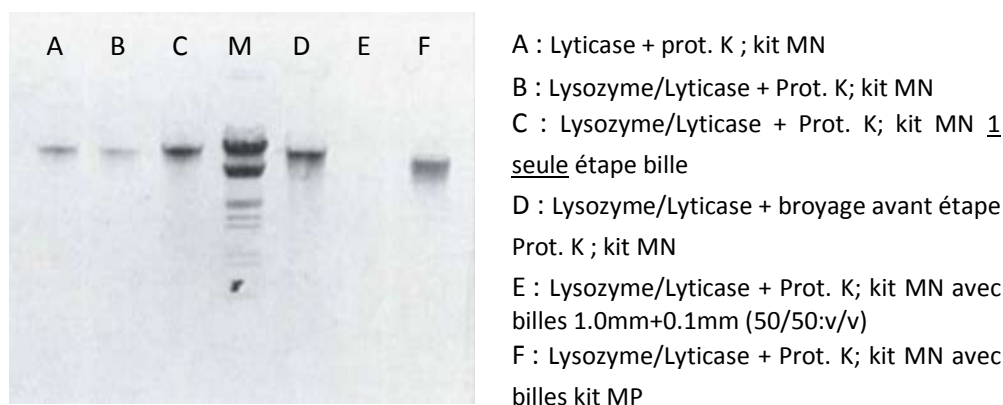


Figure 52 : résultat d'extraction d'ADN de spores d'*A. niger* ; gel d'agarose 1% + BET avec dépôt de 5 μl d'extrait d'ADN

Tout d'abord, si l'on considère seulement les résultats des dénombrements de spores germées, on peut voir que les comptages sur boîte et sur cellule de Malassez ne sont pas concordant. Cependant, plusieurs raisons pourraient être à l'origine de ces différences :

- Le comptage sur cellule de Malassez peut être approximatif si l'échantillon n'est pas préparé correctement. En effet, les spores ont été soniquées et homogénéisées au vortex afin que la solution soit bien homogène. Les spores dans un milieu aqueux ont tendance à faire des agglomérats.
- Il est possible qu'une perte ait eu lieu lors de la récupération du surnageant contenant l'ADN après le broyage du kit d'extraction. Ce surnageant contenait peut être aussi des spores.

Au niveau des rapports de quantité d'ADN extrait, l'extraction la plus efficace est celle qui fait intervenir deux étapes de broyage. Le rapport d'extraction est en effet de 843,1. Les résultats de dénombrement des spores sur cellules de Malassez et sur milieu gélosé indiquent que seulement 2 à 3 % des spores ont germées après l'extraction alors que plus de 13 % le sont après une seule étape de broyage aux billes. En outre, la qualité des ADN extraits et déposés est correcte avec présence de smires de faibles intensités (Figure 52). D'après ces résultats, les enzymes lysozyme, lyticase et protéinase K sont indispensables.

Ici, l'extraction ne s'est faite que sur des spores de champignons, très résistantes aux solvants chimiques et aux broyages mécaniques. Certains microorganismes sont susceptibles de ne pas être aussi résistants, notamment certaines bactéries et levures. Celles-ci seront très rapidement lysées, leur ADN se retrouvera en suspension et sera susceptible d'être endommagé par les conditions de traitement. C'est pourquoi le choix du protocole D ne sera définitif qu'une fois testée sur l'ensemble des organismes tests. Dans l'hypothèse où l'ADN soient trop endommagés, il avait été envisagé d'effectuer l'extraction en 2 étapes ; une première où l'on effectue la lyse enzymatique et un broyage dans des conditions « douces ». Le surnageant contenant l'ADN des cellules « fragiles » est alors récupéré. La seconde étape où seront réalisées 2 autres broyages avec du tampon de lyse frais afin de détruire les cellules les plus résistantes. Le second surnageant sera récupéré et additionné au premier.

Le protocole D a été réalisé sur des cultures pures des souches tests *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *F. graminearum* et *A. niger* afin d'observer l'efficacité d'extraction et l'impact sur la qualité des ADN extraits.

Protocole d'extraction D :

- Etape enzymatique d'1 h à 37 °C avec lysozyme + Lyticase
- Broyage de 15 sec, puissance 5
- Etape enzymatique de 2 h à 56 °C avec la Protéinase K
- Extraction avec le kit NucleoSpin Soil Macherey Nagel (1 broyage durant l'extraction)

Pour optimiser l'étape de broyage et observer son impact sur la concentration finale en ADN, 2 extractions ont été réalisées sur les 5 espèces, avec comme seules différences, l'étape de broyage lors de l'extraction avec le kit. Les résultats sont présentés dans le Tableau XXVI et la Figure 53.

- 5 ml de culture culotés et nettoyés repris dans 200 µL de TE (*E. coli*, *B. subtilis* et *S. cerevisiae*) ou masse repris dans 200 µL (Tableau XXVI). Pour les témoins d'extraction, 200 µL de TE
- 1 h d'incubation avec de la lyticase et lysozyme à 37°C
- Broyage de 15 sec, puissance 5
- 2 h d'incubation avec la protéinase K
- Extraction selon le protocole Macherey-Nagel avec Broyage de 30 sec ou 3 x 10 sec avec mise à la glace entre chaque (puissance 5,5)
- Reprise dans 50 µl de tampon d'élution

Tableau XXVI : résultats d'extractions d'ADN de 5 espèces de micro-organismes différents

	Poids de matériel ou quantité	Concentration en ADN en ng/ μ L	Rapport Concentration / poids (ou nombre UFC)
<i>E. coli</i>1	5.10 ⁹ UFC	147,2	1472
<i>E. coli</i>2	5.10 ⁹ UFC	175,7	1757
<i>B. subtilis</i>1	10 ⁹ UFC	102,5	5125
<i>B. subtilis</i>2	10 ⁹ UFC	104,8	5240
<i>S. cerevisiae</i>1	5.10 ⁸ UFC	87,4	874
<i>S. cerevisiae</i>2	5.10 ⁸ UFC	93,6	936
<i>F. graminearum</i>1	32,87 mg	25,5	38,8
<i>F. graminearum</i>2	32,17 mg	29,6	46,0
<i>A. niger</i>1	5,42 mg	74,0	682,7
<i>A. niger</i>2	6,45 mg	79,5	616,3

xx1 : l'étape de ribolyse est réalisée en une fois 30 secondes

xx2 : l'étape de ribolyse est réalisée en 3 fois 10 secondes avec mise à 0°C entre pour éviter la chauffe des échantillons

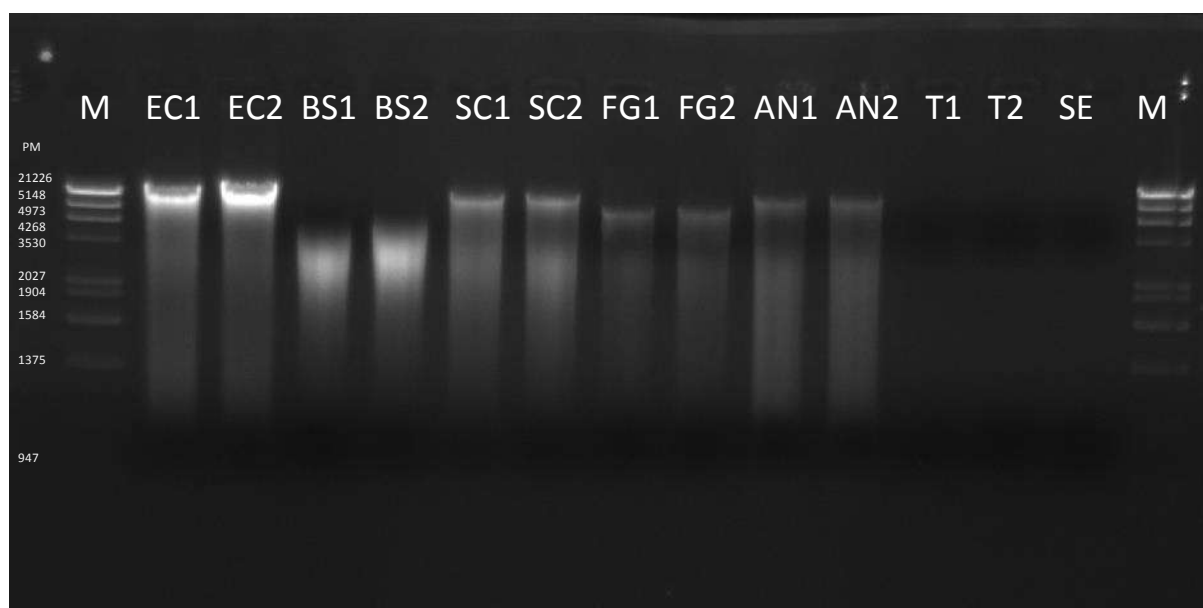


Figure 53 : résultat d'extractions d'ADN de 5 espèces différentes. Gel agarose 1% + BET ; 5 μ L de marqueur (M) Phage Lambda ECORI/HindIII ; T1 et T2 : témoins (-) d'extraction (EC = *E. coli* ; BS = *B. subtilis* ; SC = *S. cerevisiae* ; FG = *F. graminearum* ; AN = *A. niger* ; T = Témoin négatif d'extraction ; SE = tampon d'élution des ADN)

D'après les rendements, l'extraction réalisée avec 3 broyages de 10 sec plutôt qu'une seule de 30 sec semble légèrement plus efficace. Son intérêt pour la qualité des ADN semble cependant très limité.

Chaque extraction d'ADN présente une fraction avec une bande haute intense suivie de smires. Les smires indiquent une dégradation des molécules d'ADN mais ceux-ci s'estompent entre les bandes de 1300 et de 947 pb du marqueur de masses moléculaires. Ceci indique que la très grande majorité de l'ADN extrait possèdent des fragments supérieurs à 1000 pb ce qui est plutôt positif. En effet, dans notre étude, ces extraits d'ADN avaient deux vocations, toutes deux pour des applications faisant intervenir la PCR. Les PCR utilisés dans le travail de thèse (cf. IV.3.2. Régions cibles et choix des amorces) ont fait appel à des amorces qui amplifient des fragments dont la taille est inférieure à 500 pb. La probabilité pour qu'une cassure ait lieu dans cette portion est donc modérée.

Bien que très contraignant pour l'ADN (dégradation modérée), ce protocole d'extraction D a été choisi pour la suite des travaux. Il permet d'optimiser l'extraction simultanée des espèces bactériennes et fongiques les plus résistantes comme nous l'avons vu avec les spores d'*A. niger* et les cellules végétatives de *B. subtilis*, bactérie GRAM (+) dont la résistance est accrue grâce à leur paroi riche en peptidoglycane. Nous avons pu utiliser ces extractions pour nos essais de profilage génétique (PCR-DGGE) mais également pour la PCR en temps réel. Mais avant cela, il a fallu faire le choix des amorces à utiliser.

3.1.4. Extraction de l'ADN de pomme

Pour tester la positivité des amorces vis-à-vis des matrices de la pomme, de l'ADN de pommes a été extrait par plusieurs méthodes.

Des extractions ont été réalisées à partir d'épiderme de pommes Golden Biologique nettoyées et désinfectées ainsi qu'à partir de pépins décorticulés.

Les analyses de qualité de l'ADN extrait ont montrés que l'ADN extrait à partir de pépins était de meilleure qualité et ne possédait pas de pollutions d'ADN microbiens comme pour celui extrait d'épiderme (Résultats non montrés). Il n'a donc pas été possible de quantifier seulement l'ADN du végétal lors de l'extraction sur épiderme, l'ADN des espèces microbiennes naturellement présentes étant toujours présents après nettoyage. Les pépins étant protégés par la chair, ils sont inaccessibles aux contaminants.

3.2. Régions cibles et choix des amorces

Les possibilités offertes par la PCR en temps réel ou PCR quantitative (PCRq) sont très grandes à condition d'en maîtriser les paramètres. Le premier à prendre en compte et le plus important est celui de la spécificité de ce que l'on veut étudier. En effet, la spécificité (ou sélectivité) est définie par l'expérimentateur en fonction de son domaine de recherche. Elle peut être très aigüe lorsque l'on s'intéresse à une espèce voire à une souche particulière. A l'inverse, elle peut également être très large jusqu'à l'embranchement, voire le règne, de la classification phylogénétique.

Nous avons lors de nos travaux, expertisés différentes possibilités et combinaisons. En s'appuyant sur la littérature, nous avons testé des couples d'amorces différents. Néanmoins, ils amplifient tous l'ADN des régions codant pour les ARN ribosomiques. Ces régions sont très utilisées en phylogénie du fait de leur particularité d'évolution. En effet, les ADNr sont composés de plusieurs domaines dont les vitesses d'évolution diffèrent. Les domaines à forte évolution temporelle vont diverger plus rapidement d'une espèce à une autre alors que ceux à faible évolution vont être conservés chez plusieurs espèces. Selon le degré de conservation, il est ainsi possible de « classer » les espèces en genre, les genres en classe, etc. Les études phylogénétiques sont basées sur ces particularités.

Dans notre cas, nous avons réalisé un travail où nous avons d'abord recherché des couples d'amorces qui sont spécifiques du règne des champignons. Cela est possible en ciblant des domaines des ADNr à très faibles taux de variations. Ensuite, nous avons restreint le champ d'étude aux classes majoritaires du règne des champignons.

Ainsi, 4 couples d'amorces ont été sélectionnés pour la réalisation de PCRq, 3 basés sur le principe de PCRq au SYBR Green et 1 selon la méthode Taqman® (amorces + sonde fluorescente) :

3.2.1. SYBR Green

- Amorces NL1 : selon la littérature, (Cocolin *et al.*, 2000; Kurtzman and Robnett, 1998; El Sheikh *et al.*, 2012), ce couple d'amorces amplifie 253 pb de la région D1/D2 de l'ADNr 26 / 28 S chez les champignons. Il est utilisé dans la littérature plus particulièrement pour des études de profils génétiques d'échantillons contenant des levures :

NL1for : 5'-GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

LS2rev : 5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'

- Amorces U1-U2 : selon la littérature (Khot *et al.*, 2009; Möhlenhoff *et al.*, 2001; Sandhu *et al.*, 1995), ce couple amplifie 260 pb d'une région variable de l'ADNr 28 S des champignons :

U1for : 5'-GTGAAATTGTTGAAAGGGAA-3'

U2rev : 5'-GACTCCTTGGTCCGTGTT-3'

- Amorces nu-SSU : selon la littérature, (Borneman and Hartin, 2000), les 4 phylums majeurs des champignons sont amplifiés : les *Ascomycota*, les *Basidiomycota*, les *Chytridomycota* et les *Zygomycota*. La zone amplifiée de 422 pb est située sur une partie de la région V4 et la région V5 du gène de l'ARNr 18S (Figure 54) :

nu-SSU-for : 5'-TTAGCATGGAATAAT**RR**AATAGGA-3'

nu-SSU-rev : 5'-TCTGGACCTGGTGAGTTTCC-3'

(En gras, acides nucléiques dégénérés : R = A ou G)

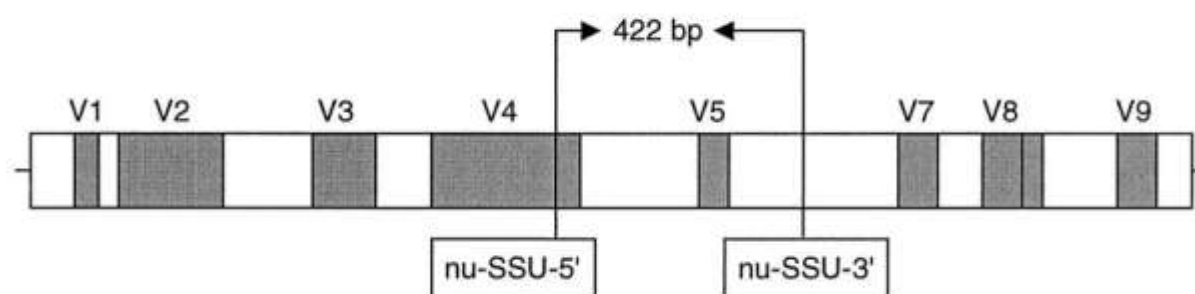


Figure 54 : schéma de l'ADN ribosomique 18 S chez la levure *S. cerevisiae*. (V = domaine variable)

3.2.2. Taqman®

- Amorces Fungi-Quant : ces amorces (1^{er} degré de sélectivité) sont dessinées pour amplifier une région de l'ADNr 18 S chez les champignons (Liu *et al.*, 2012). Elles sont couplées avec une sonde Taqman® qui s'hybride sur les amplifiats et permet ainsi un deuxième degré de sélectivité.

FungiQuant-for : 5'- GGRAAACTCACCAGGTCCAG -3'

FungiQuant-rev : 5'- GSWCTATCCCCAKCACGA -3'

Sonde : [FAM] 5'- TGGTGCATGGCCGTT -3' [BHQ-1]

(En gras, acides nucléiques dégénérés : R = A ou G ; S = G ou C ; W = A ou T)

[FAM] : 6-carboxyfluorescéine est un fluorophore possédant une longueur d'onde d'excitation maximale à 495 nm et une longueur d'onde d'émission maximale à 520 nm. La molécule *Quencher* qui lui est associé est BHQ-1 (Black Hole Quencher®) absorbe les radiations lumineuses sur une plage de 480 nm à 580 nm. Son rôle est d'empêcher l'excitation de FAM et de piéger ses émissions de photons résiduels.

Pour nous permettre de faire le choix du couple d'amorces le plus adapté à la quantification par PCR en temps réel de champignons dans un échantillon biologique de pomme, nous avons d'abord mis au point les protocoles PCRq sur les souches tests précédemment utilisées pour l'extraction ADN. Des recherches sur les banques de données bioinformatiques ont également été effectuées.

Les protocoles de préparation des échantillons avec les concentrations en réactifs, les conditions de PCR, les réglages des appareils sont présentés dans le matériel et méthodes (III. 3.3. Dénombrement par qPCR).

3.3. Tests des amorces « universelles »

3.3.1. NL1-LS2

Ces amorces, initialement prévues pour des amplifications par PCR-DGGE, conviennent pour la PCR en temps réel avec une taille d'amplifiat de 253 pb. Dans un premier temps (1), une mise au point des conditions de PCR (température d'hybridation, concentration en amorce, type de plaque) a permis d'obtenir les meilleurs Ct possibles avec de l'ADN de souches tests (résultats non montrés). Dans un second, des ajouts dosés ainsi que des essais sur des échantillons biologiques ont été réalisés.

- Les mises au point des conditions de PCR ont révélé une meilleure efficacité d'amplification en appliquant une température d'hybridation de 57 °C. Les concentrations en amorce ont été à 0,2 μM aussi bien pour l'amorce sens que pour l'antisens. Les durées de chaque étape du cycle d'amplification sont restées celles préconisées par le fabricant du mix PCR (Maxima SYBRGreen, Thermo Scientific).
- Les essais d'ajouts dosés d'ADN fongique au sein d'ADN de pommes ont permis d'observer si l'ADN de pomme perturbait les amplifications d'ADN de champignons. Les Figure 55 et Figure 56 présentent respectivement les courbes d'amplification et les courbes de fusion (*Melting curves*). Les valeurs de Ct sont reportées dans le Tableau XXVII. Elles ont été obtenues avec une gamme de dilution d'ADN de *S. cerevisiae* dans le mix PCR avec ou sans ADN de pomme à 10 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.

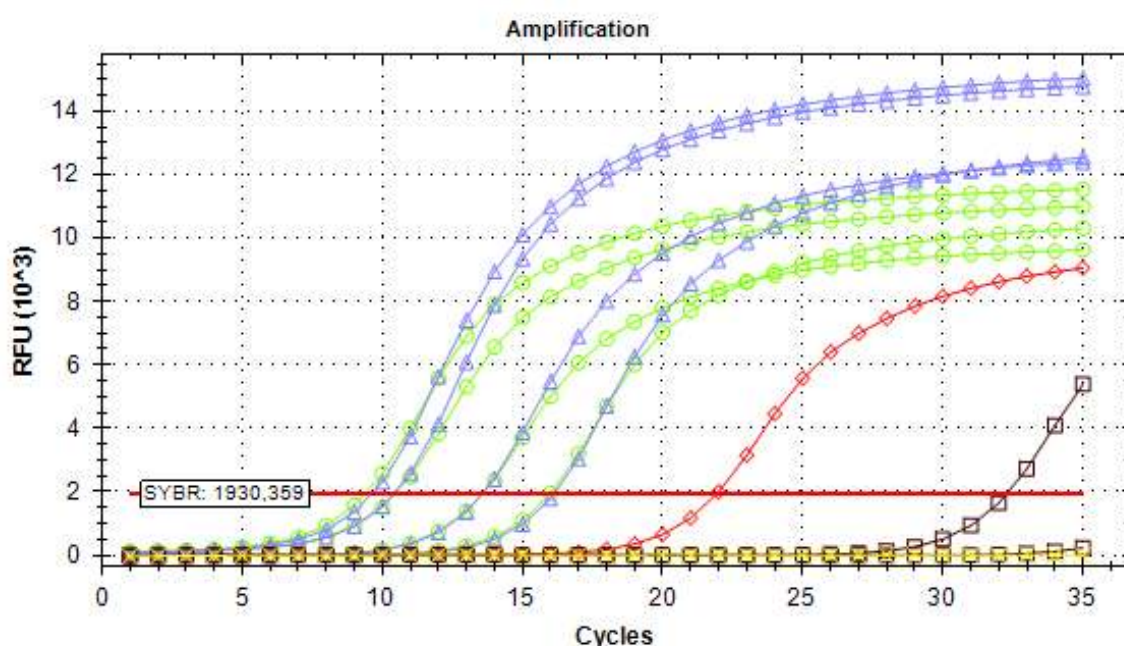


Figure 55 : courbes d'amplification d'une gamme de dilution d'ADN de *S. cerevisiae* sans (en vert) ou avec ADN de pomme Golden à 10 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ d'ADN de pépins de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification réalisée avec les amorces NL1-LS2

D'après cette figure, l'ajout d'ADN de pomme ne semble pas perturber l'amplification de l'ADN de *S. cerevisiae* car les Ct obtenus avec ADN de pomme (en bleu) ou sans (en vert) sont identiques (Tableau XXVII). Cependant, on remarque que l'ADN de pommes sort avec un Ct de 21,93 et ne peut donc pas être considéré comme faux positif (sort trop tôt du bruit de fond). Par ailleurs, les ADN de *B. subtilis* et *E. coli* ont des Ct très tardifs considérés comme négatifs.

Tableau XXVII : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 55

Echantillon	Ct
<i>S. cerevisiae</i> 10 ng	9,36
<i>S. cerevisiae</i> 10 ng + Pomme 10 ng	9,6
<i>S. cerevisiae</i> 5 ng	10,44
<i>S. cerevisiae</i> 5 ng + Pomme 10 ng	10,38
<i>S. cerevisiae</i> 1 ng	13,55
<i>S. cerevisiae</i> 1 ng + Pomme 10 ng	13,55
<i>S. cerevisiae</i> 0,2 ng	15,98
<i>S. cerevisiae</i> 0,2 ng + Pomme 10 ng	16,11
Pomme 10 ng	21,93
<i>B. subtilis</i> 20 ng	32,26
<i>E. coli</i> 20 ng	N/A
Blanc	N/A

N/A : ne dépasse pas la valeur seuil

Les courbes de fusion en fin d'essai nous permettent d'avoir des informations sur la nature des amplifiats. S'il y a plusieurs pics, cela signifie qu'il y a deux amplifiats, potentiellement d'origine différente. Une analyse des courbes de fusion nous indique que l'ADN de pomme possède un ampliat dont le pic de température de fusion (*melt peak*) est situé à 87 °C alors que pour l'ADN de levure, celui-ci est à 81 °C.

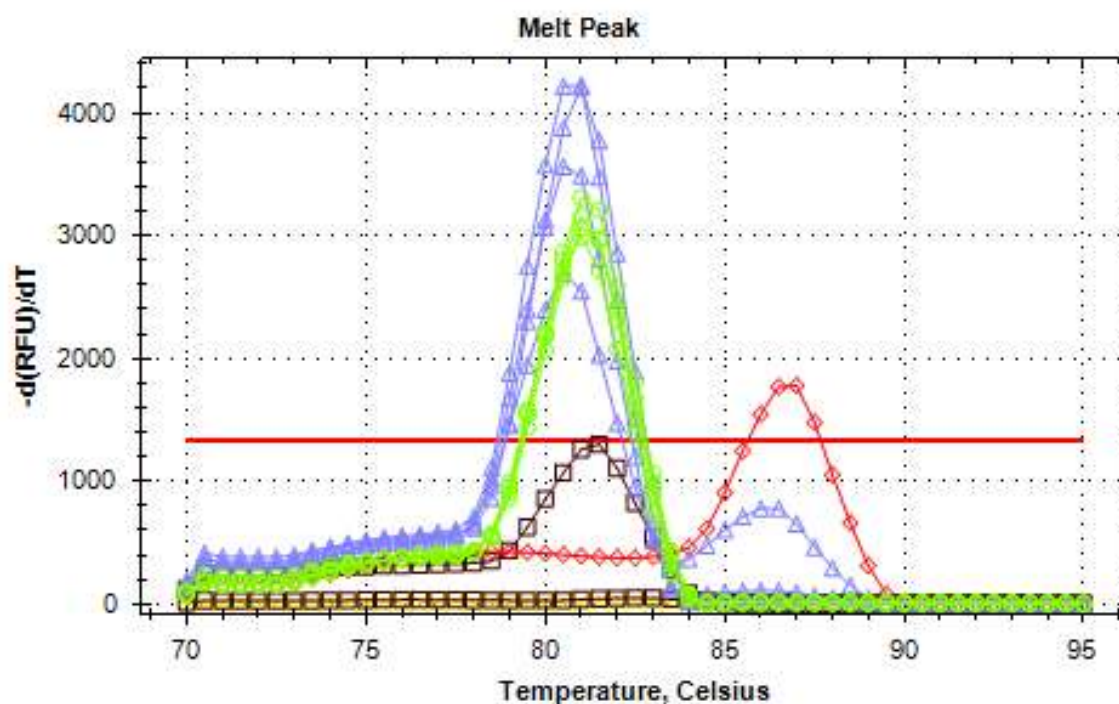


Figure 56 : courbes de fusion d'une gamme de dilution d'ADN de *S. cerevisiae* sans (en vert) ou avec ADN de pomme Golden à 10 µg / µL (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification réalisée avec les amorces NL1-LS2

Ces deux pics obtenus par avec l'ADN de pomme et de *S. cerevisiae* indique que les amplifiats sont différents par leur composition avec une proportion en nucléotide G et C supérieur pour la pomme que pour *S. cerevisiae*. Un dépôt des amplifiats sur gel d'agarose 1,5 % (résultats non montrés) n'a révélé aucune différence de masses moléculaires entre les 2. Par ailleurs, le pic à 87 °C (pic spécifique de la pomme) n'est présent que dans la plus faible concentration en *S. cerevisiae*. Ceci indique une spécificité plus importante des amorces pour les molécules d'ADN d'origine fongique.

Ensuite, des échantillons biologiques d'épiderme de pomme possédant des charges fongiques naturelles différentes (cf. IV. 2.3. Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage) ont également été amplifiés dans les mêmes conditions :

- Echantillon de pommes Non Traitées à J0 chargé à 10^6 UFC / g d'épiderme
- Echantillon de pommes Bio à J0 chargé à 10^5 UFC / g d'épiderme
- Echantillon de pommes Conventionnelles à J0 chargé à 10^4 UFC / g d'épiderme
- Echantillon de pommes Conventionnelles à J8 chargé à 10^3 UFC / g d'épiderme

Les résultats sont présentés dans la Figure 57 et Tableau XXVIII pour les courbes d'amplification et dans la Figure 58 pour la courbe de fusion.

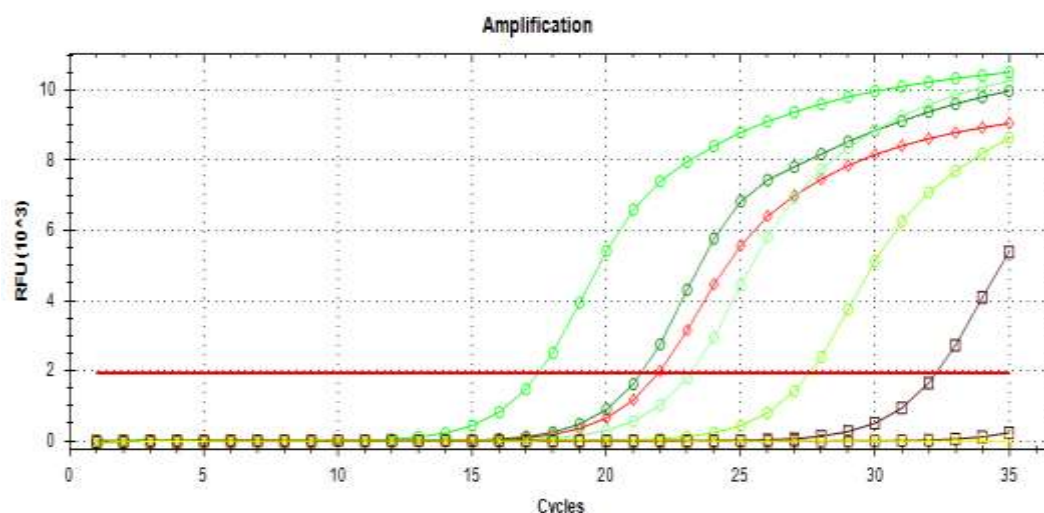


Figure 57 : courbes d'amplification d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes présentant des charges microbiennes différentes. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventiionnelles à J0 et Conventiionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification par NL1-LS2

Nous constatons que les courbes des extraits de pommes ne suivent pas l'ordre logique de leurs contaminations. En effet, les plus contaminées, les Non Traitées, devraient avoir un Ct inférieur aux Bio. Or, les Bio possèdent un Ct plus faible que Non Traitées. De même pour C-J0 et C-J8 où C-J0 devrait avoir le plus faible Ct (Tableau XXVIII). Il n'existe donc aucune répartition logique des Ct.

Tableau XXVIII : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 57

Echantillon	Ct
Pomme 10 ng	21,93
NT-J0 10 ⁶ UFC / g	21,27
B-J0 10 ⁵ UFC / g	17,44
C-J0 10 ⁴ UFC / g	27,53
C-J8 10 ³ UFC / g	23,12
<i>E. coli</i>	N/A
<i>B. subtilis</i>	32,26
Blanc	N/A

On notera que la courbe d'extrait de pomme possède un Ct intermédiaire. Dans les courbes de fusion (Figure 57), les extraits d'épiderme de pommes possèdent tous un pic majoritaire à 87 °C

correspondent au pic « pomme ». En revanche, NT-J0 possède un second pic bien distinct (en vert foncé) à 81 °C, ce qui est normal dans la mesure où c'est la température à laquelle doit théoriquement se trouver le pic pour les espèces fongiques.

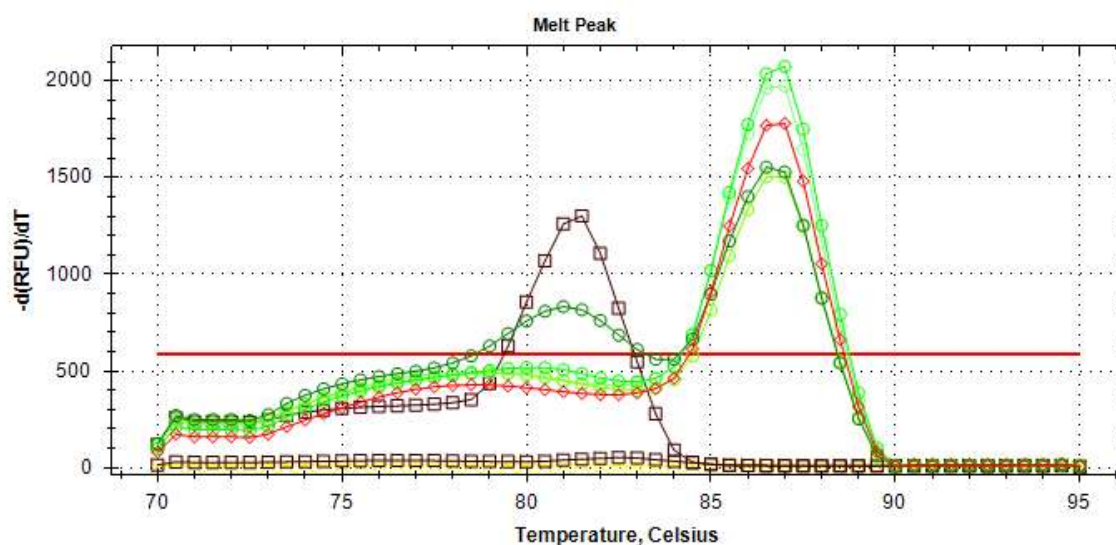


Figure 58 : courbes de fusion d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes avec différentes charges fongiques. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventiionnelles à J0 et Conventiionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ d'ADN de pépins de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification par NL1-LS2

Les amorces NL1-LS2, bien que plus affines pour l'ADN fongique, semblent être perturbées par une très forte proportion d'ADN de pomme. Les Ct mesurés sont biaisés par ces fortes proportions. Par ailleurs, la répartition des extraits (en fonction de leur Ct) ne semble pas avoir de distribution logique selon leur charge microbienne. Les concentrations en ADN mesurées au NanoDrop peuvent être erronées. En effet, des matrices d'ADN complexes peuvent posséder des molécules qui vont perturber la lecture spectrophotométrique à 260 nm. Les résultats obtenus pourraient être dus à des quantités d'ADN déposées dans chaque puits peuvent alors ne pas être équivalentes.

Suite à ces résultats, les amorces NL1-LS2 ont été abandonnées pour le dénombrement par qPCR, le problème le plus déroutant étant l'ADN de pomme qui est amplifié par les amorces. Des analyses par bioinformatiques et par PCR-DGGE sont développées dans la partie IV. 4. Etude de l'évolution des communautés microbiennes de la pomme Golden par biologie moléculaire.

En revanche, une optimisation des conditions de température de PCR pour augmenter la spécificité de ces dernières vis-à-vis de l'ADN fongique n'est pas envisageable car la température de fusion de l'ADN de pomme (87 °C) est supérieure à celui des champignons (81 °C). En augmentant la température d'hybridation, nous favoriserions l'amplification de l'ADN de pomme. En la diminuant, la spécificité diminuerait et nous observerions une augmentation des mésappariements, et donc une augmentation du phénomène.

Pour ces différentes raisons, nous avons expérimenté d'autres amorces pouvant être utilisées dans la quantification d'espèces fongiques.

3.3.2. U1-U2

Les amorces U1-U2 ont les mêmes origines que les amorces NL1-LS2. Elles ont initialement été prévues pour des amplifications par PCR-DGGE avec une taille d'amplifiat de 260 pb (chez *S. cerevisiae*). Dans un premier temps (1), une mise au point des conditions de PCR (température d'hybridation, concentration en amorce) a permis d'obtenir les meilleurs Ct possibles avec de l'ADN de souches tests (résultats non montrés). Dans un second, des ajouts dosés ainsi que des essais sur des échantillons biologiques ont été réalisés.

- Les mises au point des conditions de PCR des amorces U1-U2 ont révélés une meilleure efficacité d'amplification en appliquant une température d'hybridation de 57 °C. Les concentrations en amorce ont été définies à 0,2 μ M aussi bien pour l'amorce sens que pour l'antisens. Les durées de chaque étape du cycle d'amplification sont restées celles préconisées par le fabricant du mix PCR.
- Les essais d'ajouts dosés d'ADN fongique ont été réalisés comme précédemment pour les amorces NL1-LS2 (Figure 59 et Figure 60 et Tableau XXIX).

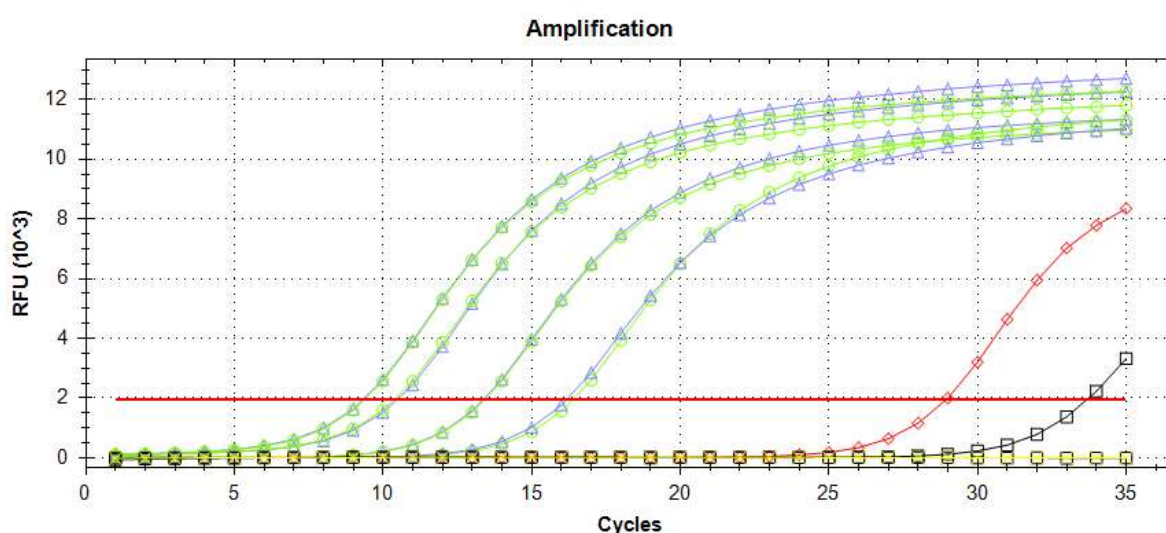


Figure 59 : courbes d'amplification d'une gamme de dilution d'ADN de *S. cerevisiae* sans (en vert) ou avec ADN de pépins de pomme Golden à 10 μ g / μ L (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 μ g / μ L d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification réalisée avec les amorces U1-U2

D'après la Figure 62 et comme pour les amorces NL1-LS2, l'ajout d'ADN de pomme ne semble pas perturber l'amplification de l'ADN de *S. cerevisiae* par les amorces U1-U2. Les Ct obtenus avec ADN de pomme (en bleu) ou sans (en vert) sont identiques (Tableau XXIX). Cependant, on remarque également que l'ADN de pommes sort avec un Ct de 28,92. Ce Ct est élevé et ne peut pas être considéré comme une amplification aspécifique. L'étude des courbes de fusion confirme ce constat (Figure 60).

Tableau XXIX : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 59

Echantillon	Ct
<i>S. cerevisiae</i> 10 ng + Pomme 10 ng	9,3
<i>S. cerevisiae</i> 10 ng	9,36
<i>S. cerevisiae</i> 5 ng + Pomme 10 ng	10,45
<i>S. cerevisiae</i> 5 µg	10,35
<i>S. cerevisiae</i> 1 ng + Pomme 10 ng	13,35
<i>S. cerevisiae</i> 1 ng	13,39
<i>S. cerevisiae</i> 0,2 ng + Pomme 10 ng	16,16
<i>S. cerevisiae</i> 0,2 ng	16,36
Pomme 10 ng	28,92
<i>B. subtilis</i> 20 ng	33,66
<i>E. coli</i> 20 ng	N/A
Blanc	N/A

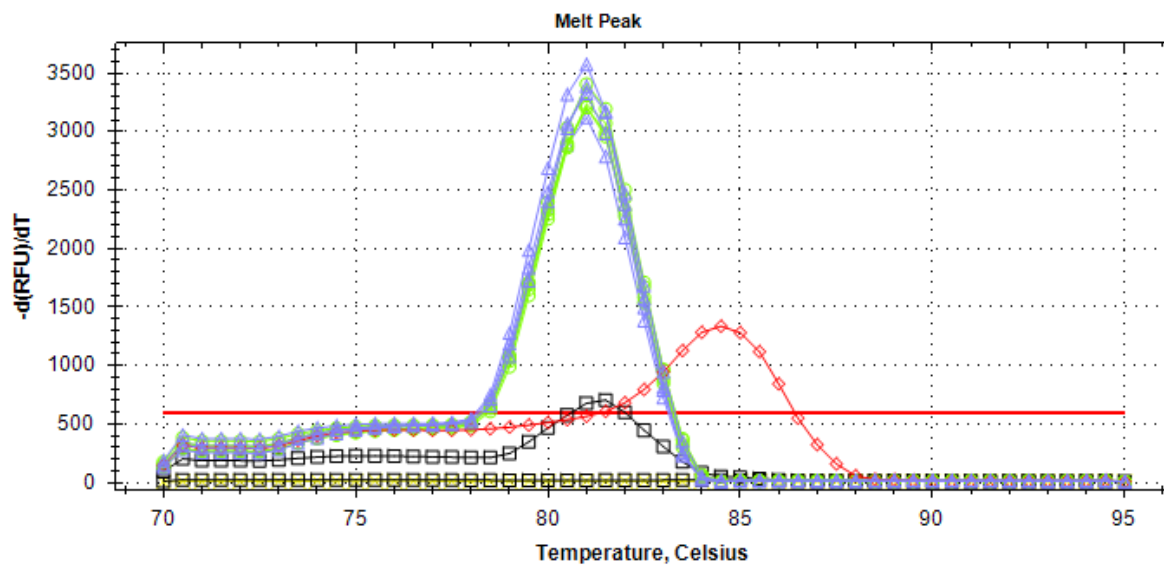


Figure 60 : courbes de fusion d'une gamme de dilution d'ADN de *S. cerevisiae* sans (en vert) ou avec ADN de pomme Golden à 10 µg / µL (en bleu). En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul.
Amplification réalisée avec les amorces U1-U2

Les courbes de fusion confirment le constat fait avec les courbes d'amplification des *S. cerevisiae* et de la pomme. L'amplifiat chez cette levure possède un point de fusion égal à 81 °C alors que la

pomme en possède un à 84 °C. Comme pour les amorces NL1-LS2, l'amplification de l'ADN de champignon est favorisée car pour les ajouts dosés d'ADN de *S. cerevisiae*, le pic apparenté à celui de l'ADN de pomme n'est pas visible, même dans les plus faibles concentrations (0,2 µm).

Les échantillons biologiques d'épiderme de pomme possédant des charges fongiques différentes ont aussi été amplifiés dans les mêmes conditions que précédemment (NL1-LS2). Les résultats sont présentés dans la Figure 61 et **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** pour les courbes d'amplification et dans la Figure 62 pour la courbe de fusion.

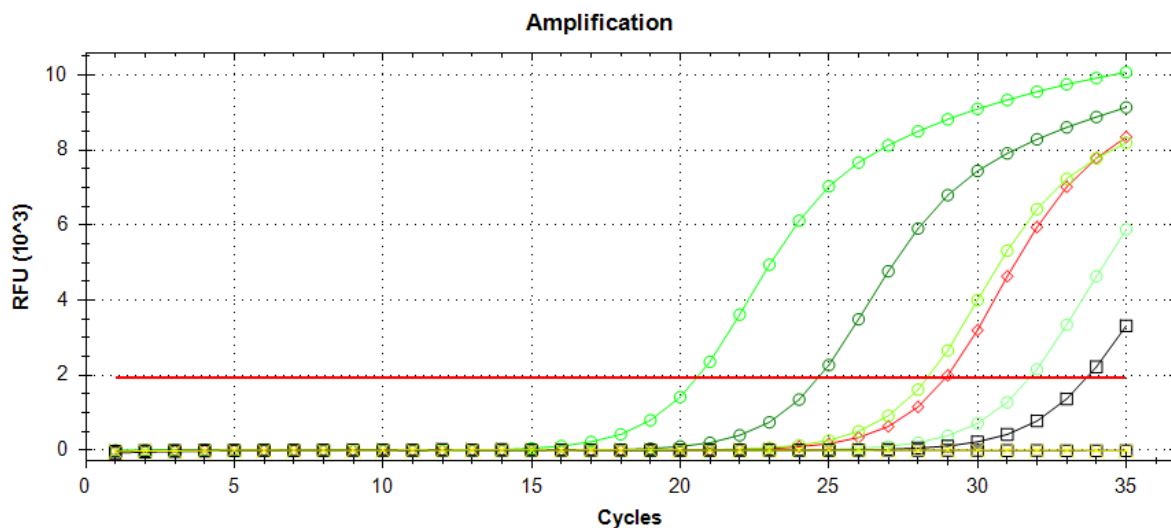


Figure 61 : courbes d'amplification d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes de différentes charges microbiennes. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventiionnelles à J0 et Conventiionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pépins de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul.

Amplification par U1-U2

Comme dans le cas de l'amplification avec NL1-LS2, nous constatons que les courbes des extraits de pommes ne suivent pas l'ordre logique de leurs contaminations. Les plus contaminées, les Non Traitées, devrait avoir un Ct inférieur aux Bio. Or, les Bio possèdent un Ct plus faible que Non Traitées. Cette tendance n'est pas répétée ici avec C-J0 qui possède un Ct plus faible que C-J8 comme attendu (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). En observant dans l'ordre les Ct des Bio, Non Traitées, C-J0 et C-J8, ils sont chacun espacés les uns des autres de 3 à 4 cycles. Or, leur charge fongique a été évaluée avec des différences de 1 log (théoriquement 3,25 Ct). De ce fait, en émettant l'hypothèse d'une erreur (inversement des Bio et Non Traitées), la distribution des échantillons serait logique. Cependant, on notera que seul NT-J0 et B-J0 se démarquent du Ct de l'échantillon de pomme. Pour confirmer ce constat, il serait intéressant de réaliser l'expérience en pratiquant des ajouts dosés d'ADN, de concentrations connues. En revanche, les courbes de fusion (Figure 62) nous indiquent bien la présence de plusieurs molécules d'ADN amplifiées.

Tableau XXX : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 61

Echantillon	Ct
Pomme 10 ng	28,92
NT-J0 10 ⁶ UFC / g	24,63
B-J0 10 ⁵ UFC / g	20,55
C-J0 10 ⁴ UFC / g	28,3
C-J8 10 ³ UFC / g	31,74
<i>E. coli</i>	N/A
<i>B. subtilis</i>	33,66
Blanc	N/A

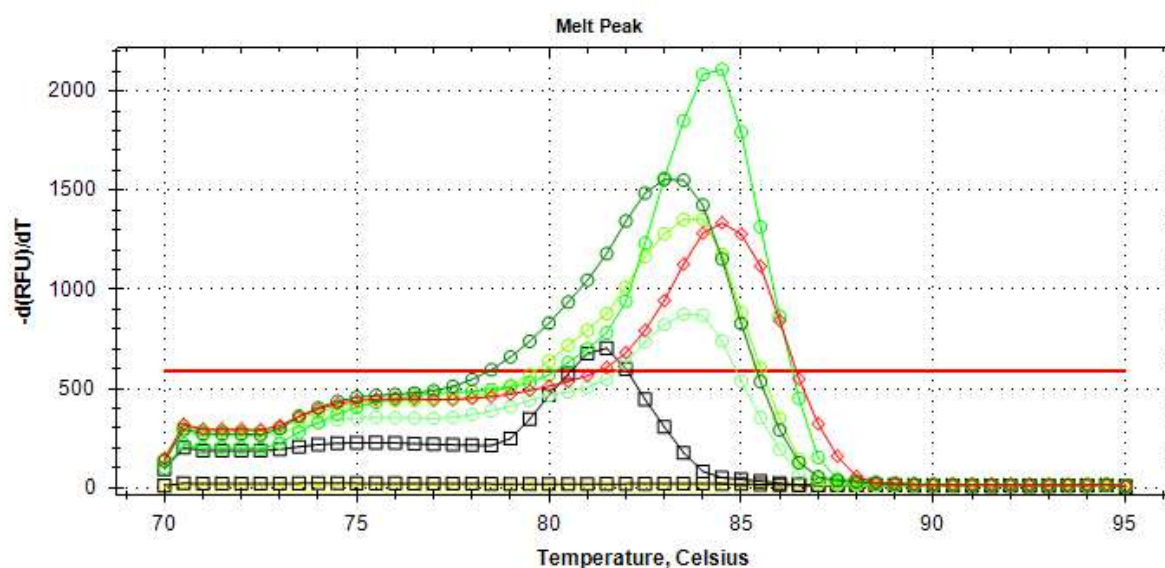


Figure 62 : courbes de fusion d'extraits d'ADN d'épiderme de pommes de différentes charges microbiennes. En vert, du plus foncé au plus clair : Non Traitées, Bio, Conventiionnelles à J0 et Conventiionnelles à J8. En rouge, courbe obtenue avec 10 µg / µL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification par U1-U2

Les pics sont majoritaires situés à 84 °C. Cependant, on remarque que ceux-ci s'étirent aux alentours de 81 °C, température où se situent potentiellement les pics correspondant aux champignons.

Il n'est pas possible dans le cas d'U1-U2 d'augmenter la spécificité en augmentant la température d'hybridation lors de la PCR. Cela ne ferait que favoriser l'amplification de l'ADN de pomme (T_m plus élevée).

Les amorces U1-U2 sont également abandonnées pour les analyses en qPCR. Afin d'essayer de remédier à ces problèmes d'amplification de l'ADN de pommes, des amplifications basées sur la technologie Taqman® ont été testées. Avec ces 2 degrés de spécificité, le Taqman® élimine théoriquement une partie des amplifications aspécifiques.

3.3.3. FungiQuant

Les amorces FungiQuant sont basées sur la méthode Taqman®. Le principe de cette technologie est basé sur l'association d'un couple d'amorces et d'une sonde spécifique de la zone d'intérêt à amplifier, marquée par un fluorophore. Ainsi, lors de l'hybridation, les amorces et la sonde viennent se fixer sur l'ADN cible. Lors de l'élongation, la polymérase dégrade la sonde et le fluorophore se retrouve libéré dans le milieu réactionnel où il peut fluorescer car désolidarisé de son *quencher*. La quantité de fluorescence est donc proportionnelle au nombre de fluorophores libérés et donc de molécules d'amplifiats. Contrairement au SYBR Green, deux degrés de spécificité sont disponibles : grâce aux amorces d'une part, et grâce à la sonde d'autre part.

FungiQuant permet l'amplification d'une zone de 351 pb dans l'ADN ribosomique 18 S. Nous avons testé des ADN de souches pures *S. cerevisiae* et *A. niger*, de pépins de pommes ainsi que des épidermes de pommes naturellement contaminés. Les conditions de PCR ont été préalablement adaptées comme nous l'avons fait pour les couples d'amorces U1-U2 et NL1-LS2. Les résultats d'amplification sont présentés dans la Figure 63 et le Tableau XXXI.

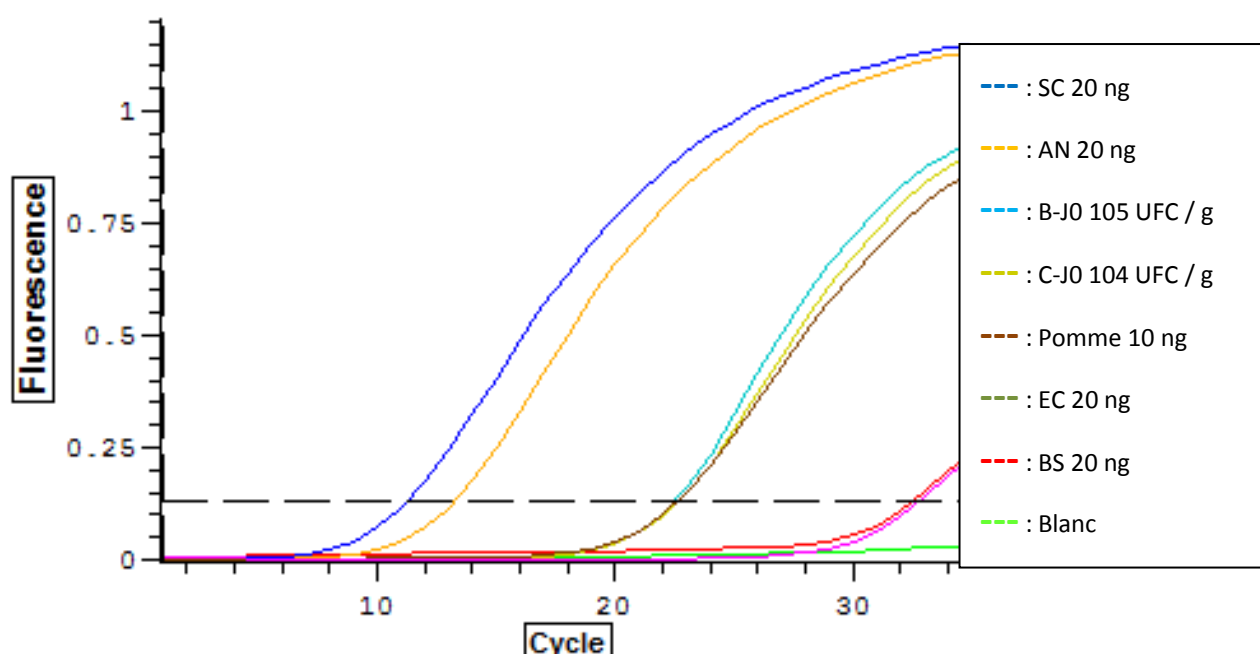


Figure 63 : courbes d'amplification d'extraits d'ADN de souche pure *S. cerevisiae* et *A. niger*, d'épiderme de pommes de différentes charges microbiennes. Amplification par les sondes FungiQuant.

Dans un premier temps, on constate que l'ADN des souches pures de champignons possèdent des Ct plus élevés avec 20 ng d'ADN (Tableau XXXI) qu'avec les amorces NL1-LS2 ou U1-U2 (Ct < 10,0 pour les souches de *S. cerevisiae* et Ct < 11,0 pour les souches de *A. niger* pour 10 ng d'ADN ; résultats non montrés).

Tableau XXXI : valeurs des Ct des différents échantillons de la Figure 63

Echantillon	Ct
<i>S. cerevisiae</i> 20 ng	11,25
<i>A. niger</i> 20 ng	13,24
B-J0 10⁵ UFC / g	22,48
C-J0 10⁴ UFC / g	22,70
Pomme 10 ng	22,65
<i>E. coli</i> 20 ng	N/A
<i>B. subtilis</i> 20 ng	32,47
Blanc	32,73

Dans un second temps, on remarque que les extraits d'épiderme de pommes naturellement contaminés à 10⁵ et 10⁴ UFC / g ont un Ct similaire à celui de l'extrait de pépins de pomme. En d'autre terme, l'ADN de pommes s'hybride avec les amorces et la sonde FungiQuant, entraînant un produit de PCR détecté par fluorescence. Afin de vérifier ce postulat, nous avons effectué des recherches sur les banques de données. Un alignement des amorces FungiQuant a été lancé dans le génome de pomme (*Malus domestica*). Pour chaque amplifiat, nous avons réalisé un alignement de séquence avec la sonde Taqman®. Nous avons alors constaté la présence d'amplifiats de différentes tailles (résultats non montrés). Par ailleurs, les bactéries (témoins négatifs) ont des Ct très élevé assimilables au blanc (mix PCR sans matrice).

Ces amorces et sonde basées sur la méthode Taqman® ne peuvent donc pas être utilisées pour un dénombrement fongique sur l'épiderme de pomme. La méthode de récupération des extraits ADN est telle qu'une quantité non négligeable de cellules de pomme sont récupérées lors de l'extraction. Cet ADN entre alors en concurrence directe avec l'ADN fongique. Il n'est alors pas possible de différencier la fluorescence due à l'ADN de pomme et à l'ADN fongique.

Pour ces raisons, nous avons donc testé un dernier couple d'amorces basé de nouveau sur la méthode au SYBR Green.

3.3.4. Nu-SSU

Les amorces nu-SSU ont été dessinées pour être spécifiques de la petite sous-unité 18 S de l'ADNr des phylums majeurs des champignons : *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridomycota* et *Zygomycota*. Elles sont utilisées en PCRq avec SYBR Green. Afin d'avoir un spectre étendu sur les différents phylums, l'amorce sens du couple nu-SSU est dégénérée sur 2 nucléotides.

Pour une utilisation optimale, des mises au point ont été nécessaires comme pour les autres types d'amorces. D'abord, les concentrations en amorces ont été optimisées, puis les températures d'hybridation et enfin les temps de dénaturation. Ces optimisations ont été réalisées sur les souches tests. La Figure 64 et la Figure 65 montrent respectivement les courbes d'amplification résultantes et les courbes de fusion. Dans le Tableau XXXII sont reportées les valeurs des Ct.

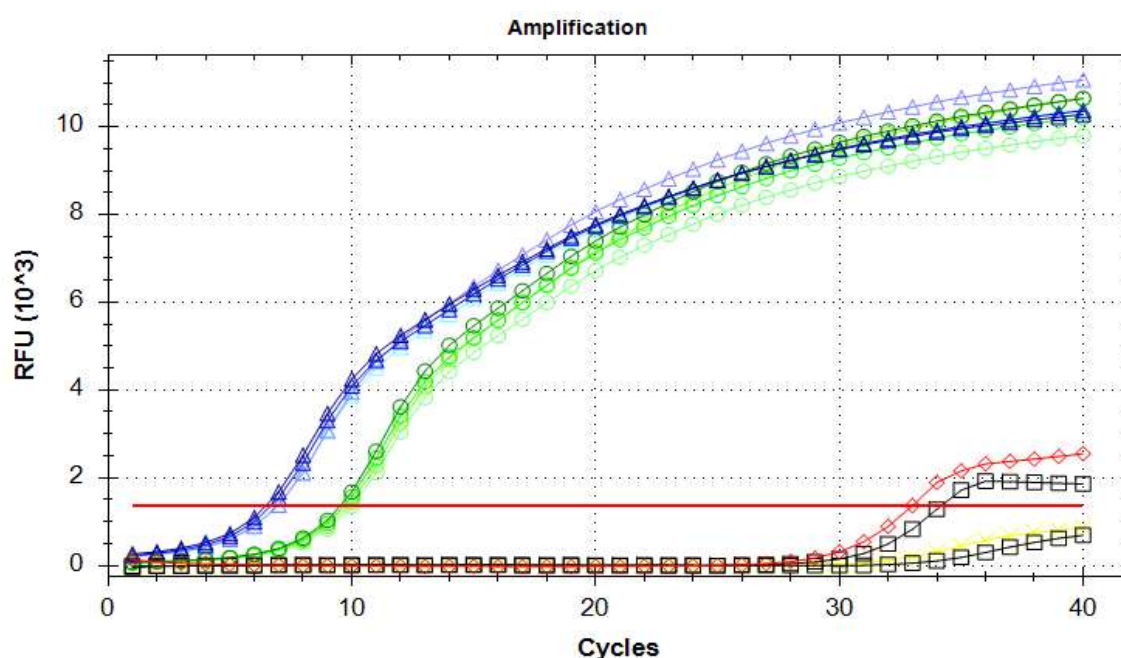


Figure 64 : courbe d'amplification d'*A. niger* (en vert) et *S. cerevisiae* (en bleu) avec différentes concentrations en amorces sens (0,7 et 0,9 μM) et antisens (0,2 et 0,5 μM). En rouge, courbe obtenue avec 10 μg / μL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification avec les amorces nu-SSU

Les changements de concentration n'ont pas une très grande influence sur la qualité de la PCR. Que ce soit pour *S. cerevisiae*, *A. niger* ou *F. graminearum* (résultats non montrés), les variations maximales de Ct sont comprises entre 0,5 (pour *S. cerevisiae* et *A. niger*) et 1,0 cycle (pour *F. graminearum*). Dans tous les cas, les concentrations permettant les meilleurs Ct sont 0,9 μM pour l'amorce sens et 0,5 μM pour l'amorce antisens. En ce qui concerne les témoins négatifs, la pomme possède un Ct de 32,96 et *B. subtilis* un de 34,15 (Tableau XXXII), valeurs très élevées considérées comme « bruit de fond » lors des cycles de fin de PCR. La courbe pour *E. coli* et le Blanc reste quant à elles en dessous du seuil. Les courbes de fusion confirment ces résultats avec un pic majoritaire pour les champignons situés à une température de 81 °C ce qui atteste d'une seule espèce d'amplifiée (Figure 62). Par ailleurs, les dépôts de produits de PCR sur gel d'agarose 1,5 % ne donnent qu'une seule bande (résultats non montrés).

Tableau XXXII : valeur des Ct pour le choix des concentrations en amorces nu-SSU

Echantillon	Ct
<i>S. cerevisiae</i> Sens 0,9 μM ; Antisens 0,5 μM	6,44
<i>S. cerevisiae</i> Sens 0,9 μM ; Antisens 0,2 μM	6,65
<i>S. cerevisiae</i> Sens 0,7 μM ; Antisens 0,2 μM	6,95
<i>S. cerevisiae</i> Sens 0,7 μM ; Antisens 0,5 μM	6,9
<i>A. niger</i> Sens 0,9 μM ; Antisens 0,5 μM	9,49
<i>A. niger</i> Sens 0,9 μM ; Antisens 0,2 μM	9,64
<i>A. niger</i> Sens 0,7 μM ; Antisens 0,5 μM	9,82
<i>A. niger</i> Sens 0,7 μM ; Antisens 0,2 μM	10,00
Pomme 10 μM	32,96
<i>B. subtilis</i> 20 μM	34,15
<i>E. coli</i> 20 μM	N/A
Blanc	N/A

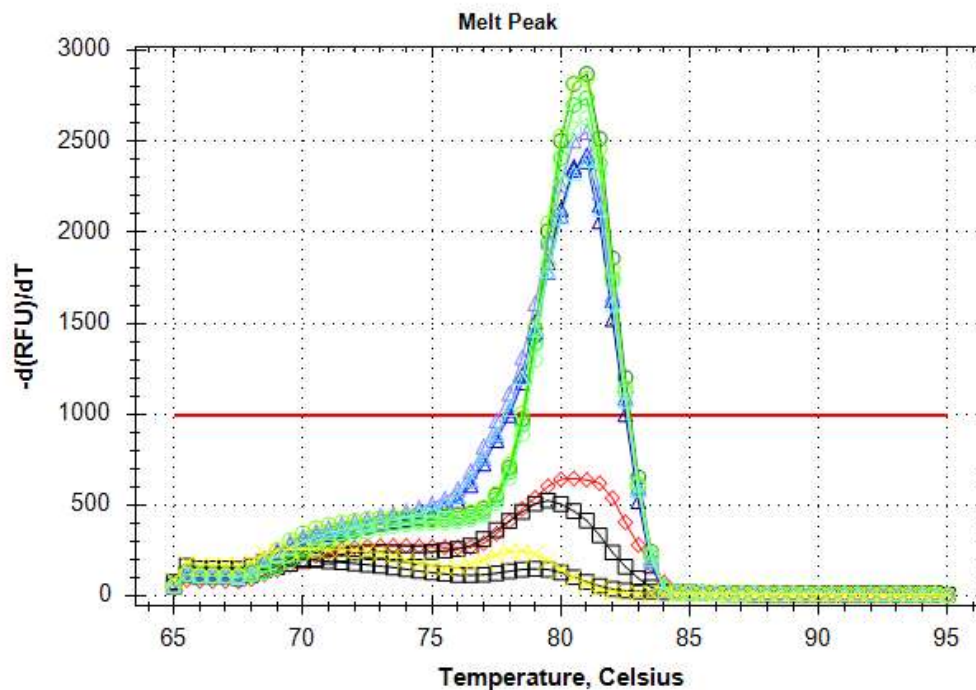


Figure 65 : courbe de fusion d'*A. niger* (en vert) et *S. cerevisiae* (en bleu) avec différentes concentrations en amorces sens (0,7 et 0,9 μM) et antisens (0,2 et 0,5 μM). En rouge, courbe obtenue avec 10 μg / μL d'ADN de pomme Golden. En noir, courbes des témoins négatifs *E. coli* et *B. subtilis*. En jaune, mix PCR seul. Amplification avec les amorces nu-SSU

Nous avons ensuite optimisé les conditions de PCR en réalisant un gradient de température d'hybridation compris entre 55 et 60 °C. Notons que l'amorce sens dégénérée possède une T_m théorique comprise entre 54,0 et 59,0 °C alors que l'amorce antisens a une T_m de 60,5 °C (Biorad CFX manager 3.1). La température d'hybridation théorique est donc comprise entre 55 et 59 °C. Les résultats des gradients sont montrés dans le Tableau XXXIII et la Figure 66 des valeurs de Ct.

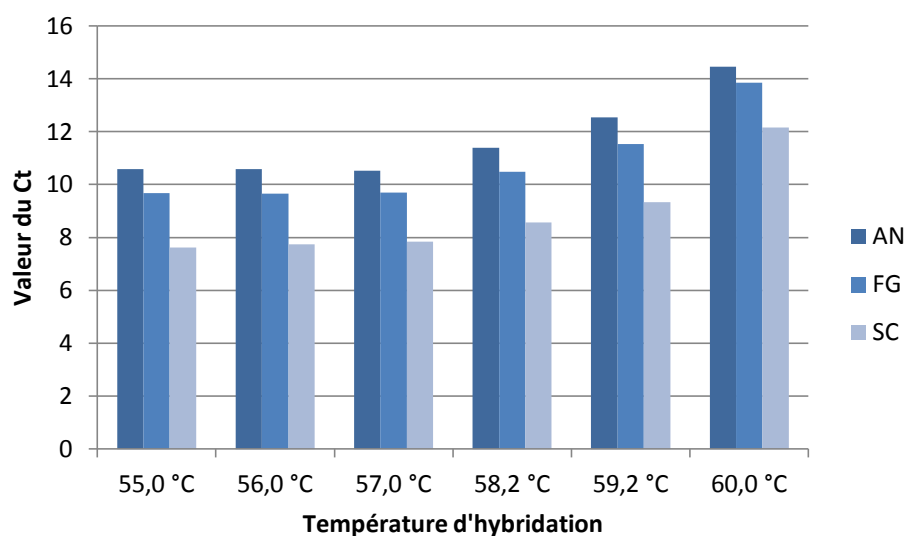


Figure 66 : évolution des Ct pour chaque microorganisme en fonction des températures d'hybridations (n=2) (AN = *A. niger* ; FG = *F. graminearum* ; SC = *S. cerevisiae*)

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas de différences de Ct pour les températures 55,0, 56,0 et 57,0 °C. Les Ct sont très proches pour les 3 souches (Tableau XXXIII). En revanche, pour les températures 58,2, 59,2 et 60,0 °C, les Ct augmentent de plus en plus indiquant une perte d'efficacité dans la PCR.

Tableau XXXIII : valeurs des Ct en fonction du microorganisme et de la température d'hybridation.

		Température d'hybridation					
		55,0 °C	56,0 °C	57,0 °C	58,2 °C	59,2 °C	60,0 °C
Echantillon	<i>A. niger</i>	10,58	10,59	10,52	11,39	12,55	14,45
	<i>F. graminearum</i>	9,67	9,65	9,70	10,48	11,53	13,86
	<i>S. cerevisiae</i>	7,61	7,75	7,85	8,57	9,33	12,15

Parmi les 3 températures optimales, nous avons choisi 57 °C pour l'hybridation afin de diminuer les possibilités de mésappariements, d'autant plus fréquent lorsque la température diminue.

Enfin, nous avons essayé d'optimiser la PCR en modifiant la durée de dénaturation initialement choisi par défaut à 30 sec. En essayant des durées de 15 sec, 30 sec et 45 sec, nous n'avons remarqué aucune différence notable entre les 3 temps (résultats non montré). Nous avons donc choisi de laisser la durée de 30 sec pour la dénaturation de l'ADN comme le préconise le fabricant du mix PCR.

Nous avons vu que parmi les 4 couples d'amorces, seul le couple nu-SSU permet d'amplifier les champignons sans être parasité par l'ADN de pomme. Ces amorces amplifient les 4 phylums majeurs du règne des champignons que sont les *Ascomycota*, les *Basidiomycota*, les *Chytridomycota* et les *Zygomycota* (Hibbett *et al.*, 2007). Les conditions finales du protocole de PCR sont citées dans le Matériel et Méthodes.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu tester les échantillons de pommes naturellement contaminés à différentes concentrations. N'ayant plus d'extrait d'ADN, le timing ne nous a en effet pas permis de réaliser de nouvelles extractions et de réaliser ces essais.

La mise au point d'une technique de dénombrement par qPCR était fastidieux et difficile ; d'abord par la spécificité des amorces envers les microorganismes cibles, ensuite, vis-à-vis de la matrice étudiée, ici, la pomme. Il est également important de noter que lors de dénombrement directement sur matrice, la réalisation de la gamme étalon avec des concentrations en ADN de microorganismes doit être réalisée au plus proche de la matrice étudiée. En effet, l'amplification des ADN au sein de matrices extraites complexes peuvent impacter les efficacités de PCR (présence probables d'ADN non spécifique, de molécules inhibitrices,...). La relation entre les valeurs de Ct et les quantités de microorganismes peuvent donc être biaisées, d'où la nécessité d'une mise au point. Il faudrait par la suite continuer l'étude avec les sondes Nu-SSU pour valider leur utilisation pour le dénombrement de flores fongiques au sein d'échantillon de pomme.

Les techniques de biologie moléculaire permettent également de caractériser les échantillons analysés grâce à leur contenu en ADN microbiens. Dans la suite de l'étude, nous avons cherché à caractériser les microorganismes présents sur les épidermes de pommes en les identifiant par séquençage mais également en réalisant des profilages génétiques des échantillons. Ainsi, chaque type de pommes possède une empreinte génétique qui lui est propre et qui permet de la différencier des autres en fonction de son contenu.

4. Etude de l'évolution des communautés microbiennes de la pomme Golden par biologie moléculaire

4.1. Dénombrement différenciés et mise en collection

Dans le sous chapitre IV. 2. « Suivi des flores microbiennes au cours du stockage des fruits », nous avons réalisé des dénombrements discriminants les flores fongiques et bactériennes. Nous avons mis en évidence que la part de la flore fongique était plus importante que celle de la flore bactérienne, notamment pour les pommes Bio où la différence s'élève à environ un logarithme décimal. Nous avons également constaté que les moisissures étaient minoritaires vis-à-vis des levures. De ce fait, la suite des travaux est centrée sur la flore fongique.

Le but de cette étude est de quantifier les microorganismes, au niveau de leur espèce, issus des pommes de différents modes de culture. Techniquement, il n'est pas envisageable d'identifier toutes les colonies issues des boîtes de dénombrement. Nous avons, dans un premier temps, catégorisé et quantifié les différentes colonies se développant sur la gélose en les discriminants selon leur phénotype : aspect des colonies et couleur. Lors de doute sur certaines colonies, une observation microscopique a été réalisée. Dans un second temps, nous avons procédé au prélèvement de fractions représentatives pour chaque phénotype. Pour ce faire, nous avons prélevé l'équivalent de \sqrt{n} colonies (où n est le nombre de colonies d'un phénotype). Ces différentes colonies sont ensuite isolées sur gélose de la même nature que leur boîte d'origine. Les colonies sont ensuite prélevées et soit repiquées dans des tubes gélosés pour la souchothèque vivante (conservée à 10 °C), soit déposées dans des micro-tubes et congelées à - 20 °C pour une étude ultérieure (souchothèque congelée).

Lors des isollements, nous avons été confrontés à des microorganismes non recultivables. En effet, certaines des colonies prélevées sur les boîtes de dénombrement ne se sont pas redéveloppées après repiquage et ce, sur les mêmes milieux de culture. Il est possible qu'après leur développement lors du dénombrement, les cellules soient mortes après l'incubation. Il n'a donc pas été possible de les conserver vivante. Elles ont cependant été congelées pour des analyses par biologie moléculaire. Les Tableau XXXIV et Tableau XXXV résument l'intégralité des phénotypes retrouvés pour la FAM et pour les levures et moisissures. On y retrouve également leur pourcentage ainsi que leur concentration sur l'épiderme des pommes.

Tableau XXXIV : description des différents phénotypes des colonies retrouvés sur les boîtes de dénombrement des levures / moisissures à J0 ; a) Pommes Non Traitées ; b) Pommes Raisonnées ; c) Conventionnelles ; d) Bio.

a) <i>Code interne / traçabilité</i>				
Phénotype	Echantillon	Code du phénotype	% phénotype tous échantillons	[UFC] / g de peau calculée
Blanche, pigment rouge	NT1	1	82,7	6,1E+05
	NT2	1		
	NT3	1		
Brun / orange	NT3	2	4,1	4,3E+04
Brun granuleux	NT3	3	0,5	
Brun rond	NT1	2	1,4	
Brun rosé	NT1	3	0,5	1,0E+04
Brun / jaune	NT2	2	1,8	4,0E+04
Ronde Jaune	NT2	4	0,5	1,0E+04
Mois blanc ocre	NT2	6	0,5	1,0E+04
Moisissure rosé	NT1	7	0,9	6,1E+04
	NT2	5		
Moisissure brune	NT3	4	0,9	2,0E+04
Moisissure marron	NT1	5	1,8	4,0E+04
	NT3	5		
Moisissure marron/vert	NT2	3	3,6	
Moisissure brune, pénètre la gélose	NT1	6	0,5	1,0E+04
Ronde Rouge	NT1	4	0,5	1,0E+04

b) <i>Code interne / traçabilité</i>				
Phénotype	Echantillon	Code du phénotype	% phénotype tous échantillons	[UFC] / g de peau calculée
Blanche, pigment rouge	R1	1	41,5	2,0E+05
	R2	1		
	R3	1		
Blanche (bossu)	R1	2	44,4	2,1E+05
	R2	3		

	R3	2		
Blanchâtre (s'étend)	R2	5	0,7	1,0E+04
Blanc / Jaune	R2	4	0,7	1,0E+04
Moisissure blanche	R1	6	3,5	1,7E+04
	R2	6		
	R3	5		
Moisissure beige	R3	6	0,7	1,0E+04
Moisissure brune	R1	4	0,7	1,0E+04
Moisissure marron	R2	7	0,7	1,0E+04
Moisissure noire	R1	5	0,7	
Moisissure brune	R3	4	0,7	
Orange	R1	3'	1,4	2,0E+04
Rosé	R3	3	1,4	2,0E+04
Rouge	R1	3	2,8	2,0E+04
	R2	2		

c)	Code interne / traçabilité			
Phénotype	Echantillon	Code du phénotype	% phénotype tous échantillons	[UFC] / g de peau calculée
Beige	C3	3	0,5	1,0E+02
Blanc	C5	1	2,9	3,0E+02
Blanc (petite colonie)	C3	4	1,0	
Blanc Nacré	C1	5	0,5	
Blanc rosé	C3	5	2,4	8,0E+02
Blanc rosé (centre colonie noir)	C5	4	5,8	
Rose violacé	C1	7	3,4	
Blanc violacé	C1	4	4,3	4,5E+02
	C2	6		
Brun	C3	2	3,8	8,0E+02
Moisissure brune	C1	8	1,2	1,0E+02
	C2	7		
Moisissure noire	C1	9	9,6	1,0E+03

	C2	1		
Jaunâtre	C1	6	1,0	9,0E+02
	C5	5	7,7	
Orangé	C5	3	6,3	
Orange nacré	C2	2	15,4	1,5E+03
	C1	1		
Rose nacré	C1	2	4,3	4,5E+02
	C2	3		
Rouge	C2	4	1,9	
Rouge / rosé	C3	1	20,7	1,6E+03
	C1	3	3,4	
Rouge / orangé	C5	2	3,8	

d) <i>Code interne / traçabilité</i>				
Phénotype	Echantillon	Code du phénotype	% phénotype tous échantillons	[UFC] / g de peau calculée
Noir bossu	B2	7	0,4	1,0E+04
Noir bossu	B2	8	0,4	
Marron / rosé bossu	B3	5	1,1	3,0E+04
Blanc ocre	B5	5	0,4	1,0E+04
Moisissure brune	B1	9	0,7	2,0E+04
Blanc nacré	B1	3	8,8	1,6E+05
	B3	3		
Blanc nacré (rose)	B2	3	9,1	
Moisissure Blanche	B4	5	0,7	1,0E+03
	B4	6		
Moisissure blanche filamenteux	B4	11	0,4	
Moisissure blanche et rouge	B4	10	0,4	
Moisissure blanche	B1	5	0,7	
	B2	10		
Ocre bossu	B1	4	0,4	1,0E+04
Moisissure brune	B4	9	0,7	1,1E+04

Moisissure brune, pénètre la gélose	B3	4	0,7	
Moisissure marron	B1	6	0,7	
Moisissure brune	B4	8	1,1	
Moisissure marron	B1	7	0,4	
Moisissure noire	B1	8	0,4	1,1E+04
Moisissure noir molle	B3	6	0,7	
Moisissure bossue noir	B2	9	2,6	
	B5	3		
Moisissure Marron et blanche	B2	5	0,7	1,0E+04
	B2	6		
Moisissure brune et verte	B4	7	1,8	
	B3	7	0,7	
	B3	9		8,8E+03
	B3	10	0,4	
	B5	4	0,4	
	B5	6	0,7	
Moisissure rose bossue	B2	4	0,4	
Rosé granuleux	B4	4	0,7	
Moisissure rose (noir sur les bords)	B4	3	1,5	6,5E+03
Moisissure rose (noir sur les bords)	B3	8	0,4	
Brun orangé	B1	2	25,5	
	B2	2		
	B3	2		1,0E+05
	B4	2		
	B5	2		
Rose corail	B1	1	36,1	
	B2	1		
	B3	1		1,4E+05
	B4	1		
	B5	1		

Tableau XXXV : description des différents phénotypes retrouvés sur les boîtes de dénombrement des levures / moisissures à J + 8 Mois : a) Pommes Bio ; b) Pommes Conventionnelles.

a) <i>Code interne / traçabilité</i>				
Phénotype	Echantillon	Code du phénotype	% phénotype tous échantillons	[UFC] / g de peau calculée
Noir bossu	B3	5	9,4	3,0E+02
	B4	5		
Moisissure marron	B5	2	3,1	2,0E+02
Moisissure verte/jaune	B5	3	1,6	1,0E+02
Orangé / rouge	B1	5	1,6	1,0E+02
Blanc / orangé	B3	2	34,4	6,5E+02
	B4	2		
	B1	2		
Blanchâtre	B5	1	6,3	
Moisissure noire	B1	4	10,9	2,3E+02
	B3	4		
	B4	4		
Rosé	B3	3	4,7	2,3E+02
	B4	3		
Rose (s'étale)	B1	3	6,3	
Rouge	B1	1	21,9	4,7E+02
	B3	1		
	B4	1		

b) <i>Code interne / traçabilité</i>				
Phénotype	Echantillon	Code du phénotype	% phénotype tous échantillons	[UFC] / g de peau calculée
Beige	C2	4	1,2	1,0E+02
Blanc centre / crème extérieur	C1	7	1,2	1,0E+02
Blanc rosé	C1	3	4,7	4,0E+02
Moisissure blanche	C3	4	4,8	1,4E+02
	C5	2		
	C4	4		

Moisissure marron	C2	6	1,2	1,0E+02
Moisissure marron	C5	1	5,9	5,0E+02
Moisissure ocre	C3	3	0,1	1,0E+01
Noir bossu	C5	3	1,2	1,0E+02
Moisissure noire	C1	5	2,4	
	C4	6		
Crème orangé	C4	3	8,2	3,0E+02
Crème orangé	C1	4	1,2	
Ocre orangé	C2	5	1,2	
Orange ocre	C5	4	3,5	
Rose (bords noir)	C4	2	5,9	2,3E+02
	C4	5		
	C1	6		
Moisissure rose	C4	1	4,7	1,3E+03
Rosé	C3	1	31,4	
	C2	1		
Rosé (s'étale)	C1	1	5,9	5,0E+02
Rouge	C1	2	1,2	2,6E+02
Rouge (rosé)	C5	5	1,2	
Rouge (rosé)	C2	2	13,2	
	C2	3		
	C3	2		

Comme nous l'avions déjà constaté précédemment, la part de moisissures est minoritaire par rapport aux levures quelques soient le mode de culture utilisé pour les pommes (milieu Sabouraud au chloramphénicol). Nous remarquons également que la diversité fongique est plus importante pour les pommes Bio que pour les autres types (plus de phénotype).

La diversité des phénotypes des levures / moisissures présents sur les épidermes de pommes a diminuée d'au moins 1 log après 8 mois de stockage (cf. B. 3. b. *Suivi de la flore fongique*). Afin de mieux définir cette diversité des flores présentes à la surface des pommes ainsi que leur évolution durant le stockage, une identification génétique des espèces cultivables sur le milieu Sabouraud au chloramphénicol a été effectuée. La part des espèces de levures / moisissures se développant sur PCA étant minoritaire (IV. B. 4. Etude des flores psychrophiles et bactériennes), les analyses par biologie moléculaire ne sont pas montrées.

4.2. Identification par séquençage

Les amorces utilisées pour le séquençage des champignons sont situées sur la partie 5,8 S (pour l'amorce sens) et la partie 28 S (pour l'amorce antisens). Elles amplifient une région de 1300 pb comprenant une partie de l'ADN ribosomique 5,8 S, l'ITS2 et la région D1/D2 de la sous-unité ribosomique 28 S (Figure 13). Une fois amplifiée, les amplifiats sont séquencés par Cogenics (Beckman Coulter Genomics, USA). Les séquences sont ensuite contrôlées avec le logiciel Chromas et comparées aux bases de données génétiques avec Blast. Pour les séquences de mauvaises qualités, celles-ci sont analysées manuellement pour corriger les erreurs éventuelles de lectures des bases (signaux trop faibles). Les résultats possédant les meilleurs scores, identité, *E value* et taux de couverture sont sélectionnés (cf. Annexe IV : Figure 116). Ils sont précis dans la majorité des cas jusqu'à l'espèce. Cependant, lorsque les séquences n'ont pu être améliorées (séquences courtes) ou dans le cas de certains groupes, il est possible de ne pas pouvoir distinguer l'espèce (résultats identiques pour plusieurs espèces).

Le Tableau XXXVI fait référence aux identifications réalisées à partir de la souchothèque. Seuls les phénotypes majoritaires (> 4 %) ont été séquencés. Dans certains cas, l'ADN n'a pu être récupéré, même après extraction et l'analyse par séquençage n'a pu être faite.

Tableau XXXVI : identification et proportion des phénotypes majoritaires de champignon retrouvés dans les échantillons de pommes à J-0 (jour de la récolte) ainsi qu'après 8 mois de stockage en froid positif (J + 8 mois).

J-0 - Jour de la récolte			
Echantillon de pomme	Code échantillon	Espèces	Pourcentage retrouvé sur boîte
Non Traitées	NT1-1	<i>Metschnikowia sp.</i>	83,0
	NT3-2	<i>Cryptococcus sp. / Bullera unica</i> *	5,5
	NT2-2	<i>Cryptococcus victoriae / tephrensis</i>	1,8
	Autres (10 phénotypes)		9,7
Raisonnées	R1-2	<i>Sarocladium strictum / Acremonium strictum</i> *	44,5
	R1-1	<i>Metschnikowia sp.</i>	41,2
	Autres (9 phénotypes)		14,3
Bio	B5-1	<i>Cryptococcus carnescens</i>	54,0
	B5-2	<i>Rhodotorula laryngis</i>	25,5
	Autres (12 phénotypes)		20,5
Conventionnelles	C3-1	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	42,4
	C1-4	Moisissure violette ¹	15,9
	C2-1	Moisissure Noire ¹	9,6

	C1-3	<i>Rhodotorula laryngis</i>	8,7
	C5-5	<i>Cryptococcus taibaiensis</i> / <i>victoriae</i> *	7,7
	C3-4	<i>Pichia anomala</i> / <i>Pichia kluyveri</i> *	4,4
	Autres (6 phénotypes)		11,3
J + 8 mois de stockage			
Echantillon de pomme	Code échantillon	Espèces	Pourcentage retrouvé
Bio	B1-2	<i>Cryptococcus carnescens</i>	40,7
	B3-1	<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	21,9
	B3-3	<i>Aureobasidium pullulans</i>	11,0
	B1-4	Moisissure noir ¹	10,9
	B3-5	<i>Ramularia coleosporii</i> / <i>pratensis</i> *	9,4
	Autres (3 phénotypes)		6,1
Conventionnelles	C2-1	<i>Rhodotorula laryngis</i>	52,9
	C2-5	<i>Bullera unica</i> / <i>Cryptococcus sp.</i> *	14,1
	C4-5	Moisissure violette ¹	11,8
	Autres (3 phénotypes)		21,2

* il n'a pas été possible de distinguer ces deux espèces phylogénétiquement très proches

¹ il n'a pas été possible d'obtenir d'information sur ces champignons. En effet, même après extraction et amplification par PCR, aucun amplifiat n'a été observé bien que le protocole et les amorces soient adaptés aux moisissures (cf. IV.3.2. Régions cibles et choix des amorces).

C'est résultat sont un approfondissement des résultats de dénombrement sur boîte avec observation des phénotypes macroscopiques (cf. IV.2.3 Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage).

D'abord, nous remarquons que le jour de la récolte (J-0), les flores majoritaires des pommes Bio et Conventionnelles ne sont pas les mêmes qui sont respectivement *Cryptococcus carnescens* (54,0 %) et *Sporidiobolus pararoseus* (42,4 %). En revanche, les pommes Non Traitées et Raisonnées possèdent à leur surface une espèce en forte proportion ; *Metschnikowia sp.* (82,0 % pour les Non Traitées et 41,2 % pour les Raisonnées). On retrouve également sur les Raisonnées une grande quantité de *Sarocladium strictum* / *Acremonium strictum* (44,5 %).

Ensuite, après 8 mois de stockage, nous pouvons constater que les espèces présentes sur les pommes Bio et Conventionnelles ont évolué (Tableau XXXVI). Pour les pommes Bio, *C. carnescens* est toujours l'espèce prédominante avec cependant une baisse de leur proportion à 40,7 %. Les espèces *Erythrobasidium*

hasegawianum et *Aureobasidium pullulans* prennent plus d'importance avec 21,9 et 11,0 %. En ce qui concerne les pommes Conventionnelles, une modification des proportions a également eu lieu avec la « disparition » de *S. pararoseus* au profit de *Rhodotorula laryngis* (52,9 %). *Bullera unica* / *Cryptococcus sp.* occupe une place plus importante avec 14,1 %.

Ces identifications n'ont pu être faites que sur les espèces cultivables. Des techniques de pointes telle que le pyroséquençage permettent maintenant d'identifier les espèces présentes sur un fruit sans que l'isolement de celles-ci soit nécessaire mais cela reste à l'heure actuelle coûteux (Taylor *et al.*, 2014).

Nous avons fait le choix dans notre étude de comparer les profils génétiques des échantillons de pommes de méthodes de cultures différents par PCR-DGGE. Cette technique permet de réaliser une sorte de code à barre caractérisant les espèces microbiennes (cultivables et non cultivables) présentes et donc l'empreinte génétique du produit (El Sheikha *et al.*, 2009) .

4.3. Profil génétique des échantillons de pommes

La PCR-DGGE permet de discriminer des fragments d'ADN possédant des masses moléculaires similaires par leur composition en nucléotide A, T, G et C. Cette différence se fait d'une part par la taille, c'est la concentration en acrylamide qui va définir le maillage. D'autre part, elle se fait grâce au gradient dénaturant en urée et formamide. Les brins d'ADN possédant le plus de nucléotides à fortes liaisons (G et C) migrent plus loin sur le gel.

Dans cette étude, nous avons observé les profils génétiques des microorganismes présents sur l'épiderme des pommes selon leur mode de cultures (Bio, Conventionnelles, Raisonnées et Non Traitées) avant et après le traitement de conservation appliqué au verger. L'évolution des profils génétiques de ces flores est également disponible du jour de la récolte jusqu'à 8 mois de stockage en chambre froide à 0 – 4 °C. Les PCR-DGGE ont été obtenues en utilisant les amorces NL1-LS2 supplémentées par une queue GC. Comme nous l'avons constaté lors des essais de PCRq (cf. C. 4. a. NL1-LS2), ces amorces sont positives avec l'ADN de pommes. Ces amplifiats de pommes sont cependant plus riches en nucléotides G et C que les amplifiats de champignon (60 % pour la pomme contre 49 % pour les champignons). Ainsi, les bandes correspondant à la « Pomme » et aux champignons n'auront pas la même distance de migration.

Avant d'analyser les différents échantillons, l'optimisation préalable du protocole de la DGGE était indispensable pour déterminer les concentrations en dénaturant, urée et formamide. Nous avons dû également établir un marqueur de migration spécifique de nos échantillons de pommes afin de pouvoir contrôler la migration et normaliser nos différents gels (Figure 67). Celui-ci a la particularité d'avoir été réalisé à partir d'une sélection de souches issues de la souchothèque vivante qui permet d'avoir de grandes quantités de matériel génétique car cultivable.

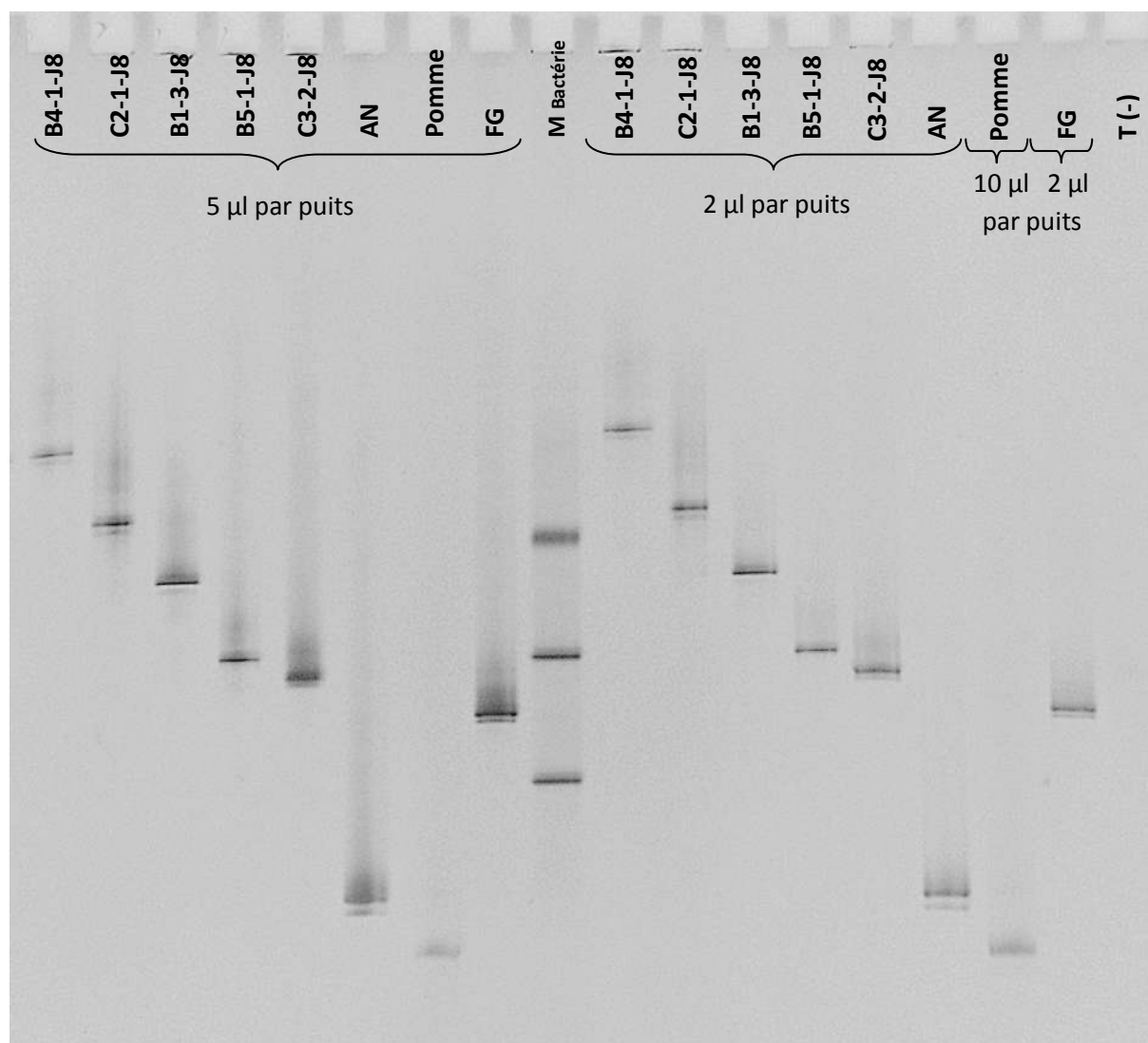
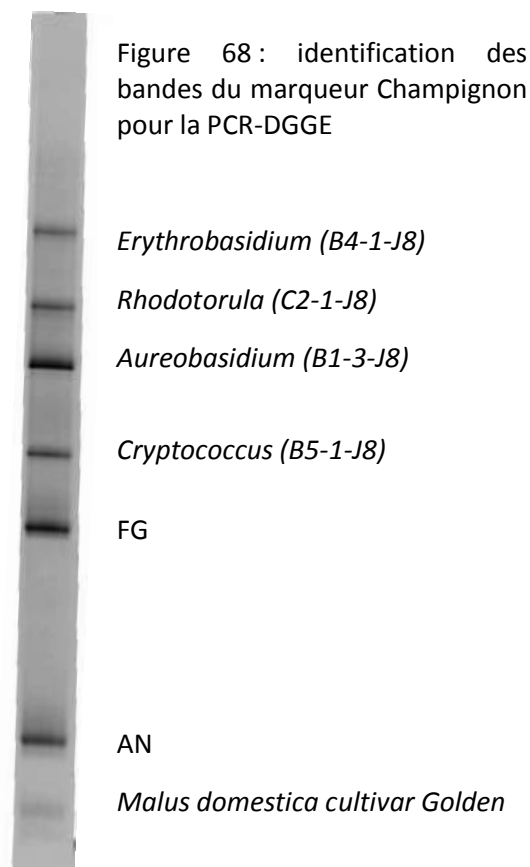


Figure 67 : gel DGGE 8 % d'acrylamide pour la mise au point d'un marqueur spécifique pour le profil génétique de la pomme. M Bactérie : marqueur interne au laboratoire pour les profils bactériens (sert uniquement à contrôler la migration) ; T (-) : témoin négatif de PCR ; AN : *Aspergillus niger* ; FG : *Fusarium graminearum* ; Xx-x-J8 : code des champignons isolés de la pomme (cf. tableau x). Gradient dénaturant 30 – 50 %, 5 h de migration à 130 V.

En sélectionnant les différentes souches, nous nous sommes assurés de créer un marqueur ayant une amplitude maximale sur le gel dans les conditions de migration définie. Les échantillons de pomme migrent les plus bas comme attendu. Deux champignons, *A. niger* et *F. graminearum* ont été ajoutés au panel des souches sélectionnées, bien qu'ils n'aient pas été isolés de la pomme (souches commerciales). Ce choix s'est fait car aucun microorganisme de la souchothèque ne couvrait cette partie du gel. Cinq levures sélectionnés et isolés de la pomme ont été déposés sur le gel après amplification. On remarque que B5-1-J8 et C3-2-J8 migrent quasiment à la même distance. Pour ces raisons, C3-2-J8 a été écarté pour les essais ultérieurs. Pour ces derniers, les migrations seront normées selon le marqueur champignon (Figure 68). Le nom des souches (identifiées par séquençage) est indiqué pour chaque bande. Par ailleurs, on remarquera que 2 μ l d'amplifiats de PCR sont suffisant pour obtenir une bande bien marquée à l'exception de l'amplifiat d'extrait de pépins de pomme Bio, où une quantité de 10 μ l est nécessaire.



4.4. Profil génétique fongique selon le mode cultural

Les différents produits de PCR issus de pommes Bio et Conventiionnelles ont été déposés sur gel afin d'étudier au cours du stockage la diversité génétique des espèces de champignons présent sur les épidermes (Figure 69).

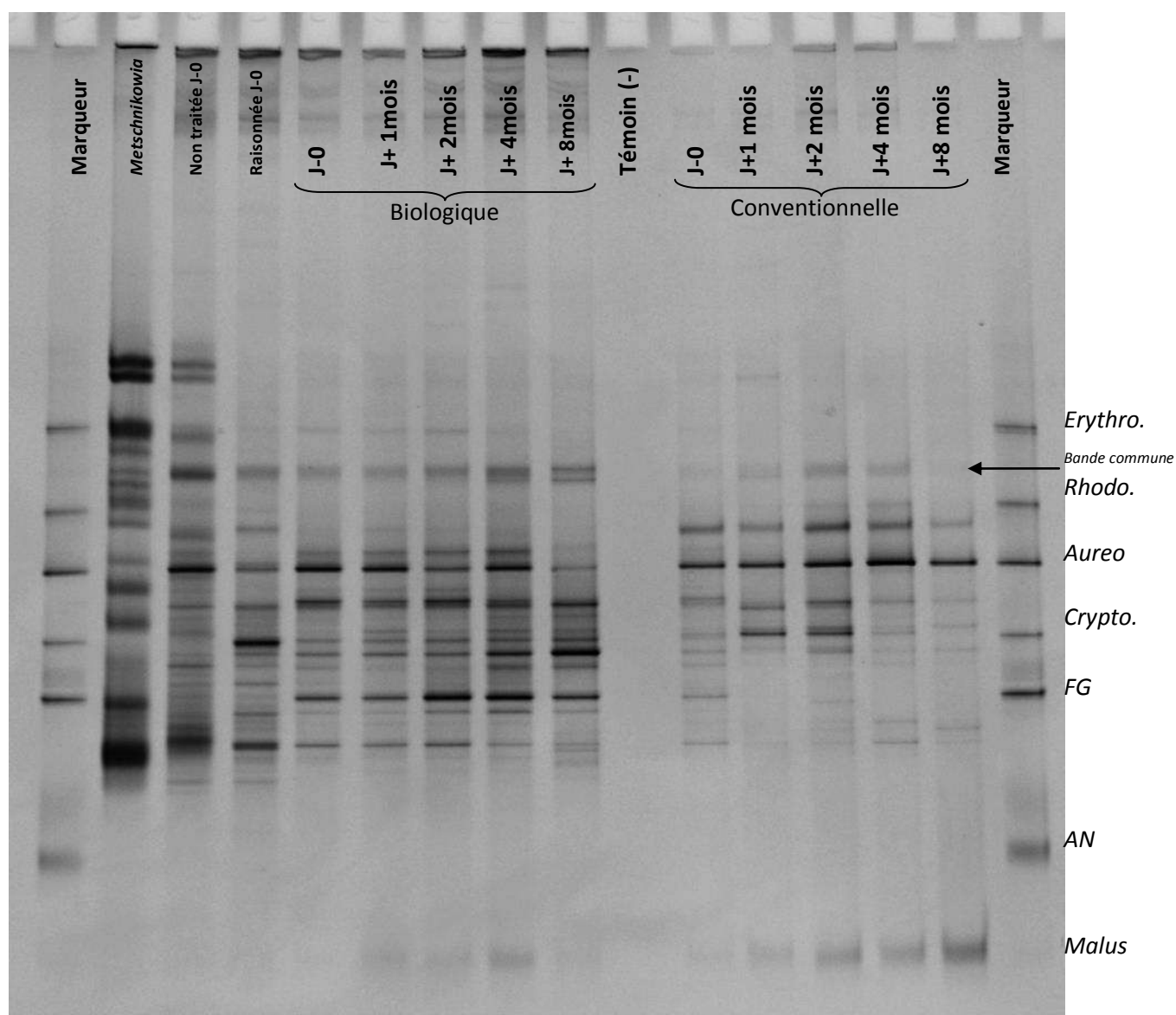


Figure 69 : gel DGGE 8 % d'acrylamide des profils génétiques des pommes issues de mode de culture différents : Conventiionnel, Bio, Raisonné et Non Traité. Marqueur Champignon : marqueur interne champignon ; T (-) : témoin négatif de PCR. Gradient dénaturant 30 – 50 %, 5 h de migration à 130 V.

4.4.1. Le jour de récolte : J0

- Amplifiat de la pomme (*Malus*)

Nous avons constaté que les profils génétiques des échantillons de pommes de culture diverses présentaient des divergences. Pour chaque échantillon de pomme, la bande correspond à l'amplifiat de la pomme (qui migre le plus loin sur le gel) est présente pour chaque piste. L'analyse bioinformatique nous a permis de localiser l'amplifiat de pépins de pomme sur son génome (cf. Annexe IV : Figure 117). On remarquera que la bande *Malus* est plus intense pour les pommes Conventionnelles et les Bio. Ces bandes sont peu visibles dans le cas des Non Traitées et Raisonnées. Les protocoles d'extraction étant identiques quel que soit le mode cultural, il est fort probable que ces différences d'intensité de bandes soient dépendantes de la quantité en microorganisme. En effet, les pommes Raisonnées et Non Traitées sont les plus chargées en levures et moisissures (cf. IV.2.3. Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage). Les conditions de PCR étant adaptées à l'amplification de l'ADN des champignons (température d'hybridation), la PCR se fait de manière préférentiellement ; moins il y a d'ADN fongique, plus les polymérases sont disponibles pour l'amplification de l'ADN végétal.

- Bandes communes

Toutes les pommes possèdent une bande commune. Elle est située entre les bandes *Erythrobasidium* et *Rhodotorula*. Cette bande ne possède pas son équivalent dans le marqueur. Il n'est donc pas possible de savoir à quel microorganisme elle s'apparente. Très présente chez les pommes Non Traitées, Raisonnées et Bio, elle est moins marquée pour les pommes Conventionnelles. Cette bande a été prélevée du gel pour être amplifiée par clonage puis identifiée par séquençage.

- Pommes Bio et Raisonnées

Les pommes Bio et Raisonnées ont beaucoup de similitudes concernant les bandes mais avec des proportions différentes. Les bandes *Aureobasidium* et *Cryptococcus* sont très intenses. Les 2 bandes comprises entre *F. graminearum* et *A. niger* sont également très intenses mais n'ont pas leur équivalent dans le marqueur. De plus, lors du *screening* de la souchothèque pour la mise au point du marqueur, aucune souche n'a permis d'obtenir de bandes aussi basses dans le gel. Donc, soit les espèces correspondant aux bandes comprises entre *F. graminearum* et *A. niger* ne sont pas cultivables, soit elles n'ont pas pu être recultivées. Les bandes ont été prélevées directement sur le gel. Il est prévu prochainement de les amplifier par clonage à des fins d'une identification par séquençage (Ogier *et al.*, 2002).

- Pommes Raisonnées et Non Traitées

Ces pommes ont quelques similitudes de bandes. Elles possèdent toutes les deux les bandes d'*Aureobasidium*. De même pour la bande présente entre *Aureobasidium* et *Cryptococcus*. Cependant, d'après l'analyse phénotypique et l'identification, ces pommes possèdent à leur surface la levure *Metschnikowia*. Si pour les pommes Non Traitées, les bandes correspondant à la piste *Metschnikowia* sont

en partie visibles, elles ne le sont pas pour les pommes Raisonnées. Ce constat peut avoir deux explications. La première serait que lors de l'amplification par PCR, les réactions aient été privilégiées pour d'autres molécules d'ADN (fongique ou de pomme) présent dans l'échantillon. La seconde serait qu'en présence de nombreuses molécules d'ADN, les migrations peuvent se faire différemment que s'il n'y avait qu'une seule espèce de molécule (Ferris *et al.*, 1996). Les profils sont alors très différents.

- Pommes Conventionnelles

Les pommes Conventionnelles ont un spectre plus réduit que les autres types de pomme. Pour chaque type de pommes, on remarque la présence systématique de deux bandes ; 1 bande correspondant au microorganisme *Aureobasidium* et une autre entre *Aureobasidium* et *Cryptococcus*. Cette bande a également été découpée pour une analyse ultérieure par séquençage.

- Pommes Non Traitées

En revanche, le profil des pommes Non Traitées est particulier car lors des dénombrements sur gélose de Sabouraud au chloramphénicol, la diversité microbienne était faible (cf. IV.2.3. Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage). Deux hypothèses sont possibles : (1) les organismes cultivables sont une part minoritaire de l'ensemble des espèces présentes sur l'épiderme des pommes Non Traitées, (2) le ou les organisme(s) présent(s) sur les pommes Non Traitées ne possède(nt) pas de profil mono-bande mais multi-bandes (voir piste 2 Figure 69).

4.4.2. Evolution lors des mois de stockage

- Pommes Bio

Au cours des mois de stockage, on peut noter que certaines bandes ne sont plus présentes (cas notamment de la bande au-dessus de celle correspondant à *Aureobasidium*) alors que d'autres sont nouvelles (bande en dessous de *Cryptococcus*). Lors du stockage, l'effectif de certaines espèces peut avoir diminué, notamment à cause des conditions (température faible, absence de nutriment...). Ainsi, après 8 mois, lorsque l'on amplifie les ADN totaux extraits, les espèces minoritaires à J-0 peuvent avoir augmenté et / ou leur ADN peut être amplifiées de façon plus efficace (moins de diversité moléculaire). On peut également remarquer qu'une bande au niveau de *Cryptococcus* semble s'être intensifiée après 4 mois dans un premier temps puis après 8 mois de stockage dans un second.

- Pommes Conventionnelles

Chez les pommes Conventionnelles, le spectre n'a quasiment pas évolué. On constate la disparition de quelques bandes de très faibles intensités mais également l'extinction de la bande ayant migré au niveau du *F. graminearum* et ce dès le premier mois. Quelques bandes apparaissent sur une piste et disparaissent la piste suivante (le mois suivant). Ces bandes sont certainement dues à la variabilité intralot (espèces sporadiques).

Lors des analyses microbiologiques sur gélose et par méthode Tempo®, nous avons constaté d'abord une diminution de la charge microbienne sur les pommes aussi bien pour les Bio que pour les Conventionnelles

(IV. 2. 3. Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage). Nous avons également constaté une légère modification des compositions en flore au niveau macroscopique lors de l'étude phénotypique (IV. 4.1. Dénombrement différenciés et mise en collection). Ces constatations ont été confirmées par le séquençage des espèces principalement présentes sur gélose.

Or, nous avons pu constater que la diversité des spectres obtenus par PCR-DGGE ne permettait pas d'être expliqué par l'analyse phénotypique et par l'identification des espèces par séquençage (Tableau XXXVI). Nous avons évoqué certains facteurs pouvant être incriminés comme les migrations différentes. Selon le contenu génétique, les efficacités de PCR qui peuvent être différentes selon les espèces moléculaires présentes dans le mix PCR. Il est également important de noter que la PCR-DGGE permet l'amplification des ADN (fongique dans notre cas) des espèces cultivables mais également non cultivable. La présence de bandes inconnues est donc évidente. Pour compléter les connaissances de ces bandes, certaines ont été prélevées du gel lors de la révélation. Les ADN purifiés, amplifiés par clonage seront ensuite séquencés. Il sera ainsi possible d'obtenir d'avantage d'informations sur les bandes inconnues. Cependant, les informations seront limitées dans la mesure où les séquences font environ 250 pb. Il sera difficile de distinguer les espèces lors de l'alignement de séquence.

Malgré les différents biais évoqués, la PCR-DGGE est une méthode de choix pour étudier les populations microbiennes. Intéressante pour le suivi de la flore au cours du stockage ou au cours d'un process industriel, elle peut également être utilisée pour la détermination géographique des fruits (El Sheikha *et al.*, 2009). Nous avons vu que les profils étaient différents selon le type de culture. Il serait intéressant d'effectuer ce type d'étude sur plusieurs vergers réalisant le même type d'agriculture mais également sur plusieurs années consécutives afin de voir si les tendances sont les mêmes. Si c'est le cas, cette méthode pourrait être employée pour déterminer le mode de culture du fruit, en complément des analyses chimiques des résidus de pesticides.

4.4.3. Cas particulier des espèces multibandes

Les ADNr 26 / 28 S permettent les études phylogénétiques des écosystèmes microbiens. La diversité des espèces les constituant peut être appréhendée par le nombre de bandes présentes et leur position sur les profils de DGGE. Or, dans certains cas, il arrive que des profils génétiques de souches pures possèdent plusieurs bandes (Gelsomino *et al.*, 1999). Si ce type d'espèce vient à se trouver dans un échantillon, le nombre de bandes contenues dans le profil génétique sera plus important que le nombre réel d'espèces. La diversité microbienne de l'échantillon sera alors biaisée. Ces types de cas sont nommés « artéfacts » selon certains auteurs (Neilson *et al.*, 2013). De précédentes études ont démontré que certains artéfacts pouvaient être :

- plusieurs bandes en DGGE migrant séparément mais avoir la même séquence (Hong *et al.*, 2007)
- plusieurs bandes ayant la même position mais appartenir au même organisme dans moins de 50 % des cas (Sekiguchi *et al.*, 2001).

Dans notre cas, nous avons constaté, lors du choix des souches pour le marqueur champignon, que certaines espèces de champignons donnaient parfois plusieurs bandes bien distinctes sur le gel (résultats non montrés). D'après la littérature, ces artéfacts pourraient venir de copies multiples de gènes codant pour les ARNr. Ces copies divergeant (Cocolin *et al.*, 2001; Nübel *et al.*, 1996; Salles *et al.*, 2002), leur

contenu nucléotidique peut varier, pouvant entraîner un G+C% différent ainsi que des conformations d'amplifiat différentes au cours de la migration (Ferris *et al.*, 1996).

Les échantillons de pommes Non Traitées semblent posséder une diversité fongique importante d'après leur profil électrophorétique (Figure 69). Cette constatation est étonnante dans la mesure où les analyses sur gélose de Sabouraud au chloramphénicol avaient révélé la présence d'une espèce très fortement majoritaire (> 80 %) dans ces échantillons (IV.2.3. Suivi des flores FAM et fongiques au cours du stockage).

Cette souche s'est révélée, après analyse par séquençage, appartenir aux *Metschnikowia sp.*. Ces dernières sont des levures naturellement retrouvées sur les pommes (fleurs et fruits), mais également sur les baies de raisin (Davenport, 1976). De par leur présence naturelle, elles ont été proposées comme agent de biocontrôle pour la lutte contre *Botrytis cinerea* sur la fraise (Karabulut *et al.*, 2004), la pêche, le raisin (De Curtis *et al.*, 1996) et la pomme (Piano *et al.*, 1997).

Dans notre étude, nous l'avons retrouvée sur les pommes Non Traitées et Raisonnées. Après l'avoir isolée plusieurs fois, son ADN a été extrait puis amplifié pour être déposé sur gel DGGE (Figure 70). Nous notons la présence d'une vingtaine de bandes fortement marquées correspondant en tout point aux profils de migration des échantillons Non Traitées.

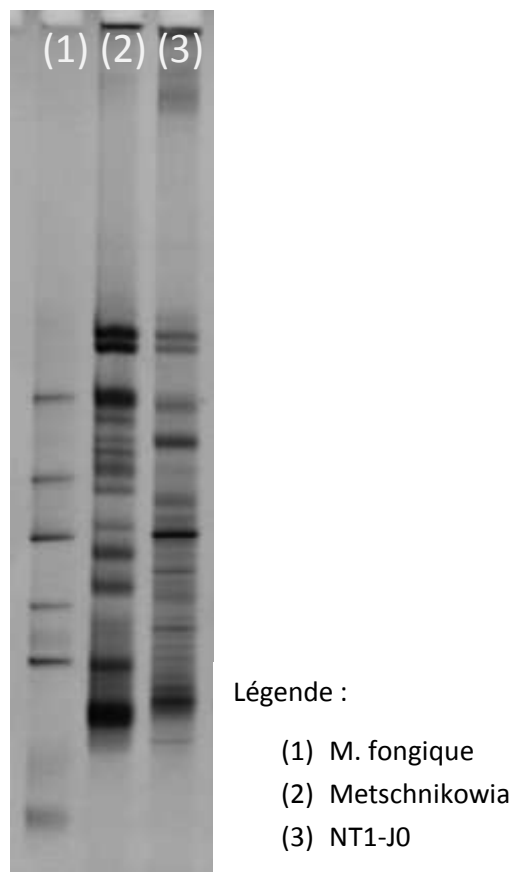


Figure 70 : profil électrophorétique de la souche *Metschnikowia sp.* isolée (piste 2) des échantillons de pommes Non Traitées (piste 3). Piste 1 : marqueur champignon.

La contamination de la culture microbienne est très peu probable car la levure a subi de nombreux repiquages pour assurer sa pureté. L'hypothèse la plus plausible serait que les amplifiats de PCR possèdent des séquences nucléotidiques divergentes et / ou de conformations spatiales différentes lors de la migration, entraînant des distances variables.

Dans la bibliographie, certains auteurs décrivent les levures *Metschnikowia* comme étant l'un des genres de levures ascomycètes les plus divergents phylogénétiquement (Kurtzman and Robnett, 1998). Celles-ci possèdent en effet de nombreuses régions des ADNr 26S et 18 S qui divergent d'une espèce à l'autre (Mendonça-Hagler *et al.*, 1993). La réalisation d'un arbre phylogénétique sur 8 espèces de *Metschnikowia* révèle l'hétérogénéité des ARNr au sein du genre (Figure 71). En effet, avec un *bootstrap* de 100, la branche la moins fiable est retrouvée seulement dans 56 % des cas, avec pourtant des espèces de référence phylogénétiquement très éloignées (*Debaryomyces hansenii* et *S. cerevisiae*).

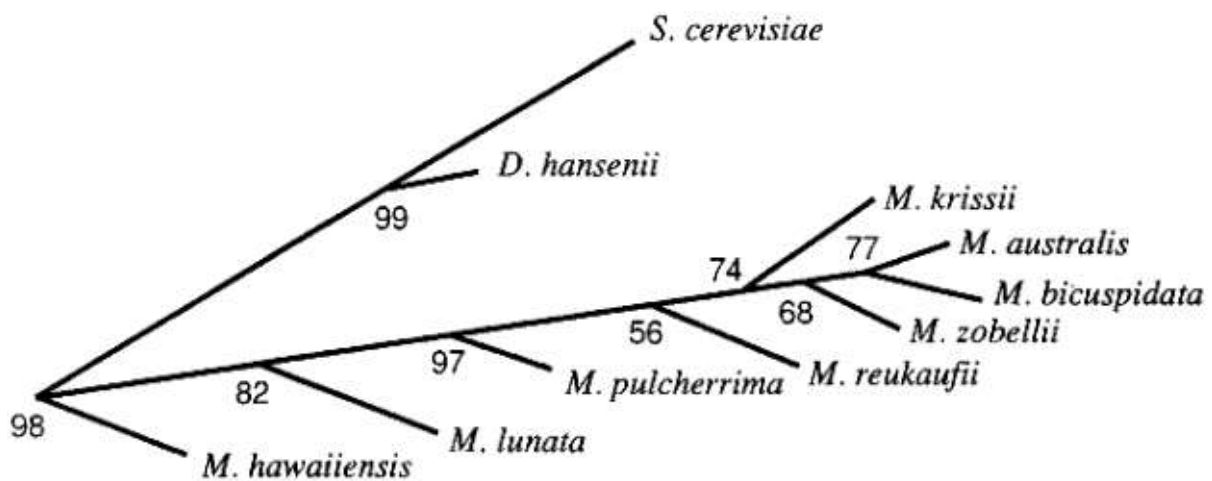


Figure 71 : arbre phylogénétique d'espèces du genre *Metschnikowia* et d'espèces de référence (*Debaryomyces hansenii* et *S. cerevisiae*) ; *Bootstrap* 100, méthode du *neighbor-joining* (d'après (Mendonça-Hagler *et al.*, 1993).

Récemment, des études ont montré que les régions D1 / D2 de l'ADNr codant pour les ARNr pouvaient posséder 18 à 25 substitutions au sein d'une même espèce de *Metschnikowia* (Sipiczki *et al.*, 2013). Plusieurs répétitions peuvent être divergentes à l'intérieur même du matériel génétique d'un seul et même organisme. Cette particularité du genre *Metschnikowia* à deux conséquences dans notre étude :

- Elle peut en effet expliquer le profil DGGE multibandes de notre souche présente sur les pommes Non Traitées. L'amplifiat obtenu grâce aux NL1-LS2 se situe à l'extrémité de la région D1 / D2 de l'ADNr 28 S (Figure 72a).
- Nous n'avons pas pu lors de l'identification par séquençage indiquer l'espèce exacte de la souche se trouvant sur les pommes Non Traitées. Comme la zone amplifiée pour le séquençage comprend la région D1 / D2 (Figure 72b), l'identification au niveau de l'espèce n'est pas possible à cause de la divergence notable des ADNr chez les *Metschnikowia*, en particulier la région D1 / D2.

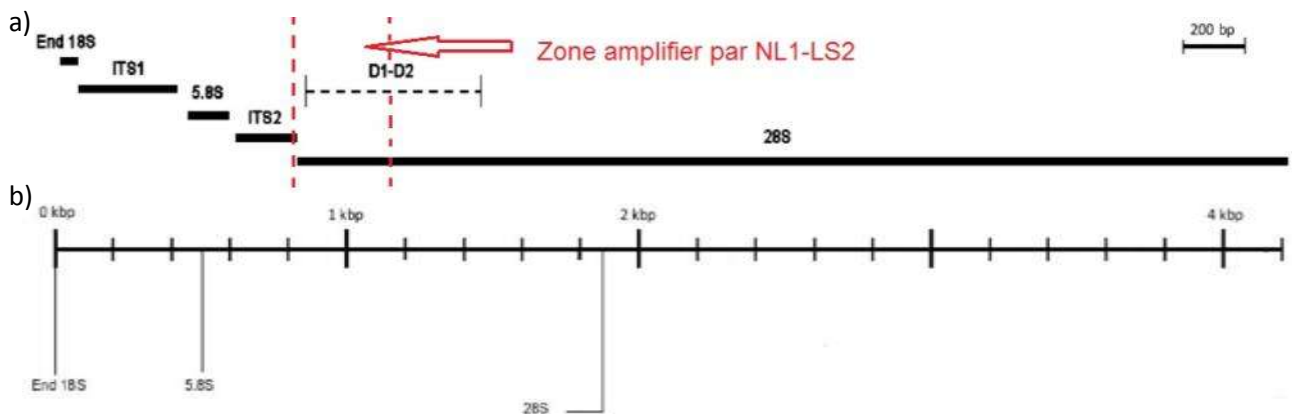


Figure 72 : schéma de l'ARN ribosomique à partir de la fin 3' de l'ARN 18 S (a) et localisation des amorces 5,8 et 28 S pour l'identification des champignons (b) (d'après (Khot *et al.*, 2009))

Dans ce genre de cas particulier, la connaissance des espèces autochtones se trouvant sur le fruit étudié est primordiale. Elle met également en avant le fait qu'une seule technique pour l'étude de la flore microbiennes n'est pas suffisante.

Nous avons vu les techniques de dénombrement et de caractérisation des matrices végétales par technique classique de microbiologie et par méthode moléculaire. Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets de traitements assainissants sur la qualité du produit et les effets sur la flore fongique présente sur le fruit. Pour cela, nous avons caractérisé un pilote de génération de vapeur basse température. Différents types de traitements ont ensuite été appliqués sur des pommes artificiellement contaminées pour observer les effets de la vapeur d'eau sur la flore contaminatrice et sur les propriétés physico-chimiques du produit.

5. Traitement à la vapeur des pommes

Nous avons vu précédemment que les flores microbiennes présentes à la surface de la pomme pouvaient être variables aussi bien d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Ces microorganismes peuvent poser certains problèmes lors de la conservation et de la transformation en produits dérivés tel que les jus et les compotes. Lorsqu'ils sont soumis à des traitements thermiques sévères assainissants (pasteurisation, stérilisation), leurs qualités nutritives et organoleptiques peuvent être altérées. Dans une optique de réduction de ces barèmes thermiques, la maîtrise de la qualité sanitaire du produit en amont de la chaîne de transformations est primordiale.

Ainsi, la mise au point d'un traitement par la vapeur d'eau a été réalisée. Précédemment, les travaux de thèse ont permis par des techniques de biologie moléculaire d'identifier les flores fongiques présentes sur l'épiderme des pommes *Golden Delicious* issues de l'agriculture Conventiennelle et de l'agriculture Bio. Avec ces connaissances, un protocole d'évaluation de l'efficacité d'un traitement à la vapeur a pu être mis en place. Différents barèmes ont été testés, la qualité sanitaire du produit, ainsi que les quantités de polyphénols ont été évaluées.

5.1. Caractérisation du dispositif de traitement à la vapeur

Le pilote vapeur a été caractérisé avant d'entreprendre tout essai de désinfection. Pour cela, une étude métrologique du pilote a été réalisée.

5.1.1. Mise en régime

Les essais ont été réalisés avec une pression de 0,2 bar dans le réservoir d'eau du dispositif et l'activation de toutes les buses dans l'enceinte. L'augmentation de la température en fonction du temps est schématisée dans la Figure 73. Le phénomène se décompose en quatre phases : une montée de température (1), une stabilisation à la température de consigne (2), une phase de régulation où la température est relativement stable (3) et une phase de chute de température (consécutive à l'arrêt de l'alimentation en vapeur) (4).

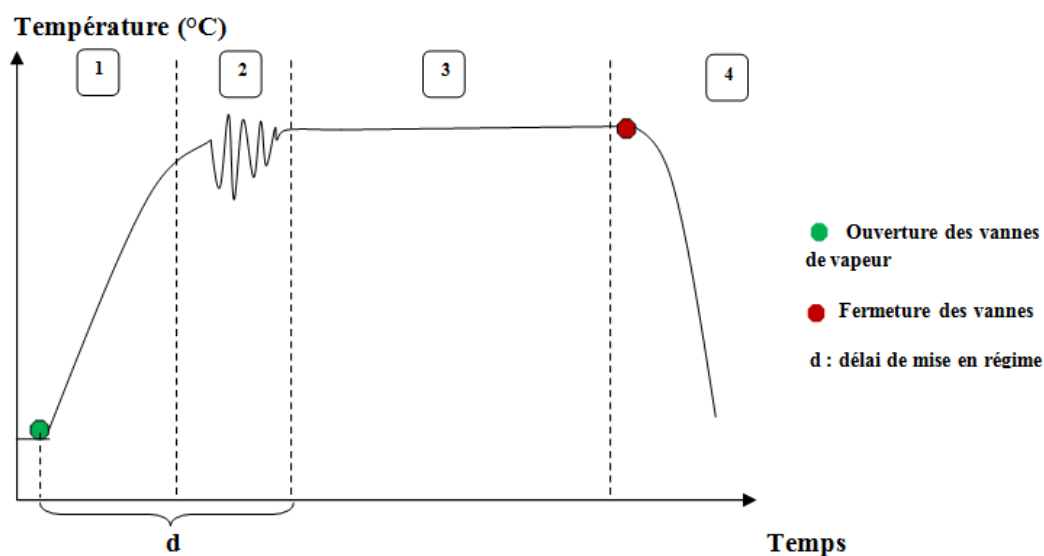


Figure 73 : profil des courbe de délai mise en régime du traitement à la vapeur (1 : Montée en température ; 2 : Stabilisation ; 3 : Régulation à la température de consigne ; 4 : Chute de température)

Le délai de mise en régime a été mesuré pour chaque température de consigne. A la température minimale de consigne 45 °C, le délai de mise en régime est de 16 min. Il augmente lorsqu'on augmente la température. A 85 °C, le délai est de 23 min (Annexe V : Tableau L). On notera que la phase (2) de stabilisation de la température est due au système de régulation utilisé. Une électrovanne, commandée par l'automate de régulation PID, s'ouvre et se ferme pour envoyer la vapeur.

5.1.2. Cartographie de l'enceinte

Afin de mesurer l'homogénéité de la température au sein de l'enceinte, les températures moyennes pour chaque position de sonde ont été comparées entre elles. Dans un premier temps, cela a permis de détecter le point froid de l'enceinte (position 4, Figure 20) où la température moyenne est constamment et considérablement inférieure aux autres points de mesure

Tableau XXXVII. Un test ANOVA a révélé que le facteur « position des sondes » a un effet significatif sur la température mesurée aux différents points de l'enceinte avec des valeurs $p < 0,001$, c'est-à-dire que la température n'est pas homogène dans l'enceinte de traitement. Cependant, la sonde M présente au centre de l'enceinte donne les valeurs de températures similaires à la température de consigne (définie par l'automate de régulation).

Tableau XXXVII : comparaison des températures moyennes (*résultats brutes non montrés*) selon consignes en différents points de mesure (A, B, C, D, M, 1, 2, 3) dans l'enceinte

Consigne (°C)	Positions de sonde ¹	Valeur de F ²	Valeur P ²	Conclusion
45	A, B, C, D, M, 1, 2, 3	8,76	< 0,001	Pas d'homogénéité
50		6,29	< 0,001	Pas d'homogénéité
55		66,74	< 0,001	Pas d'homogénéité
60		75,16	< 0,001	Pas d'homogénéité
65		97,04	< 0,001	Pas d'homogénéité
70		45,79	< 0,001	Pas d'homogénéité
75		120,31	< 0,001	Pas d'homogénéité
80		412,85	< 0,001	Pas d'homogénéité
85		265,98	< 0,001	Pas d'homogénéité

¹ la sonde 4 a été écartée de la comparaison car la position 4 est un « point froid »

² Résultats d'ANOVA au seuil $\alpha = 0,05$

5.2. Effet du traitement vapeur sur les pommes

5.2.1. Challenge Test process

Les pommes Conventionnelles étudiées ne présentent pas une charge microbienne assez importante (environ 10^3 UFC / g d'épiderme). Pour cela, nous avons procédé à un *Challenge Test* process, permettant d'évaluer l'efficacité d'un traitement. Le produit étudié est contaminé de façon artificielle à des concentrations données. Ces concentrations doivent être suffisantes pour être en mesure d'observer, dans le cas d'un traitement assainissant, une réduction microbienne sur plusieurs logs. Pour cela, nous avons mis au point une méthode de contamination artificielle. L'espèce contaminante choisie a été *Metschnikowia* d'après les résultats obtenus par biologie moléculaire. Elle est décrite comme non pathogène (Piano *et al.*, 1997), possède une capacité de croissance élevée et est naturellement présente sur les pommes (Non Traitées 80 % et Raisonnées 40 %).

La suspension contaminante est préparée à partir de culture liquide de la même façon que pour *S. cerevisiae*. L'intégralité de l'ermen est centrifugée dans des tubes de 50 mL, (10 min, 9800 g, 4°C). Les culots sont lavés à l'eau physiologique et sont repris dans 3 mL de tryptone-sel (suspension mère). La suspension contaminante est préparée en ajoutant 1,5 mL de la suspension mère contaminée à environ 10^9 UFC / mL dans un pot contenant 298,5 mL d'eau physiologique.

Deux procédures de contamination ont été étudiées ; la première sur fruit brut ; la seconde, sur fruit nettoyé avec un essuie-tout imbibé d'alcool à 70 %. Les pommes sont plongées dans la suspension contaminante et mises sous agitation (150 rpm ; 5 min).

Les dénombrements des épidermes des pommes contaminées selon les deux conditions donnent des résultats différents. Sur un effectif $n=5$, les pommes « non nettoyées » ont donné des concentrations incohérentes ($2,8 \cdot 10^5$ UFC / g d'épiderme $\pm 2,9 \cdot 10^5$). En revanche, les pommes nettoyées possédaient des concentrations de $8,2 \cdot 10^5$ UFC / g d'épiderme $\pm 3,0 \cdot 10^5$. C'est donc la technique de contamination avec nettoyage préalable qui a été retenue. Par ailleurs, l'hétérogénéité de la contamination pour les pommes « non nettoyées » pourrait être expliquée par l'hypothèse selon laquelle, les cires naturellement présentes à la surface du fruit influenceraient l'adhésion des microorganismes.

5.2.2. Effet sur la flore contaminante artificielle

L'efficacité de différents barèmes de traitement à la vapeur a été évaluée par la quantification des flores résiduelles de levures sur l'épiderme après traitement. L'analyse complémentaire du condensat de vapeur a permis de quantifier la charge de levures décrochée par lessivage de la surface des pommes (Tableau XXXVIII) (une coupelle en verre aseptisée était positionnée sous les pommes traitées pour récupérer le lixiviat). Ainsi, nous avons défini une efficacité d'assainissement qui additionne l'effet létal de la vapeur et son effet mécanique de lessivage (condensat).

Tableau XXXVIII : effet du traitement à la vapeur sur la flore artificielle de levures *Metschnikowia*

N° traitement	Barème	Charge initiale pomme ^a (UFC)	Charge résiduelle pomme viable ^b (UFC)	%Charge Résiduelle pomme viable ^c (b/a*100)	Viabilité condensat ^d (UFC)	%Viables condensat ^e (d/a*100)	%Viabilité totale ^f (c +e)	Inactivation		Assainissement épiderme (T °C + lessivage)	
								% (100-f)	Log	% (100-c)	Log
1	45 °C, 2'	1,1.10 ⁶	1,7.10 ⁵	14,8	1,4.10 ⁵	12,39	27,3	72,75	0,56	85,14	0,8
2	45 °C, 3'	5,8.10 ⁵	7,9.10 ⁵	136,8	5,2.10 ³	0,89	136,8	0,0	0,0	0,0	0,0
3	45 °C, 3'	1,1.10 ⁶	1,5.10 ⁶	136	3,4.10 ⁴	3,04	142,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	50 °C, 1'	1,1.10 ⁶	6,4.10 ⁵	57	3,7.10 ⁴	3,27	60,3	39,73	0,22	43,00	0,24
5	50 °C, 2'	1,3.10 ⁶	2,1.10 ⁵	18,6	6,7.10 ⁴	5,9	24,5	75,52	0,61	81,42	0,73
6	50 °C, 3'	5,8.10 ⁵	1,5.10 ⁵	26,6	< 1,7.10 ¹	0,003	26,6	73,45	0,61	73,45	0,58
7	55 °C, 30''	5,4.10 ⁵	8,1.10 ⁴	15,0	1,3.10 ¹	0,002	15,0	84,99	0,82	85,00	0,82
8	55 °C, 1'	5,4.10 ⁵	1,0.10 ⁵	1,8	3,5.10 ⁴	6,48	8,3	91,75	1,08	98,23	1,75
9	55 °C, 1.5'	5,4.10 ⁵	1,3.10 ⁴	2,4	0,2.10 ⁴	0,4	2,4	97,56	1,61	97,60	1,62
10	55 °C, 2'	5,4.10 ⁵	4,0.10 ⁴	7,4	3,6.10 ³	0,66	8,1	91,94	1,09	92,60	1,13
11	60 °C, 1'	6,0.10 ⁵	2,2.10 ⁴	3,7	3,1.10 ²	0,05	3,8	96,22	1,42	96,27	1,43
12	60 °C, 2'	6,0.10 ⁵	1,6.10 ⁴	2,7	5,6.10 ²	0,09	2,8	97,19	1,55	97,28	1,56
13	65 °C, 30''	5,4.10 ⁵	0,6.10 ³	0,1	2,3.10 ²	0,04	0,15	99,85	2,82	99,89	2,96
14	65 °C, 1'	5,4.10 ⁵	1,8.10 ³	0,3	2,8.10 ²	0,05	0,39	99,61	2,41	99,66	2,47
15	65 °C, 1.5'	5,4.10 ⁵	1,8.10 ³	0,3	< 4,5.10 ¹	0,008	0,35	99,65	2,46	99,66	2,47
16	75 °C, 30''	1,3.10 ⁶	<1,4.10 ²	0,01	8,9.10 ¹	0,007	0,02	99,98	3,7	99,99	4
17	75 °C, 1'	1,3.10 ⁶	1,4.10 ²	0,01	6,7.10 ¹	0,005	0,02	99,98	3,7	99,99	4
18	85 °C, 30''	1,3.10 ⁶	< 1,4.10 ²	0,01	1.10 ²	0,007	0,02	99,98	3,7	99,99	4

D'après le Tableau XXXVIII, l'inactivation thermique (effet létal) des levures ainsi que l'assainissement (la réduction de la charge par inactivation et lessivage) des pommes ont été estimés en pourcentage et en réduction logarithmique afin de comparer les différents barèmes de traitement. Les résultats des essais ont montré que l'augmentation de la température et la durée d'exposition à la vapeur ont un effet létal direct sur les levures, d'autant plus important que la température augmente. Un effet secondaire du traitement observé est le décrochage et le lessivage d'une partie des levures (viables et inactivées) de l'épiderme des pommes. Le traitement à la vapeur (basse pression, température ≤ 85 °C) des pommes contaminées contribue à leur assainissement par la combinaison d'une action thermique létale et d'un nettoyage (action mécanique) par lessivage de la surface. Cependant, ce phénomène de lessivage ne représente qu'une part minoritaire dans le phénomène d'assainissement.

Pour un traitement à 50 °C pendant 1 minute, l'assainissement est estimé respectivement à 43,0 %. A partir de 55 °C pendant 1 minute, l'assainissement atteint une réduction de 1 log, soit 90 % de la charge initiale alors que pour 65 °C, il est estimé à plus de 2 logs (soit plus de 99 %). Dans le cas des traitements à 75 °C et 85 °C, les pourcentages d'assainissement obtenus est de 99,99 % ce qui équivaut à 4 logs de réduction logarithmique (valeur maximale obtenue) (Tableau XXXVIII).

Par ailleurs, les traitements à 45 °C n'ont pas donné de résultats cohérents.

5.2.3. Effet sur la couleur des pommes

L'étude des effets du traitement vapeur sur la couleur ont été réalisées avec des pommes non contaminées. En fonction de la température appliquée, les pommes traitées avaient un brunissement soit marqué (détectable à l'œil nu), soit faible et non-appréciable. Pour cela, nous avons analysé les paramètres L^* pour chaque traitement et quantifier le brunissement (III. 1.5. **Caractérisation physico-chimique de pommes**).

Les traitements à des températures supérieures ou égales à 65°C ont provoqué un changement de couleur marqué de l'épiderme des pommes (Figure 74b) comparés aux pommes témoins (Figure 74a).

Pour des traitements entre 55 et 65 °C, les valeurs du paramètre L^* avant et après le traitement ont été comparées par un test ANOVA (Tableau XXXIX).

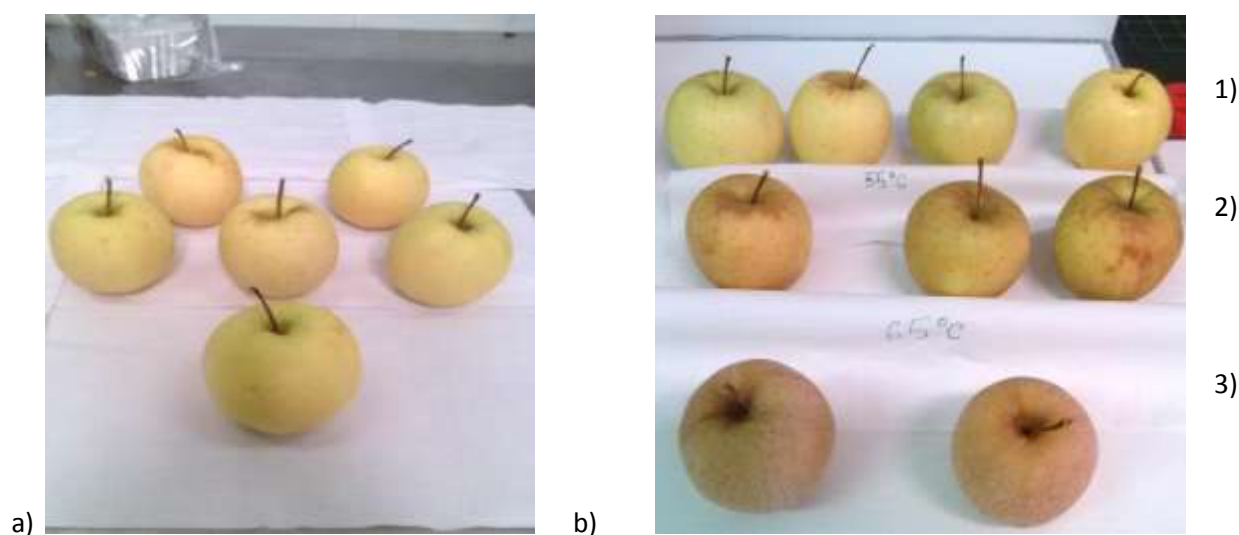


Figure 74 : photos de pommes Conventionnelles traitées à la vapeur : a) Echantillon de pommes conventionnelles non traitées ; b) Pommes traitées à la vapeur : 1) 55 °C : 30 sec à 2 min ; 2) 65 °C : 30 sec à 1,5 min ; 3) 75 °C : 30 sec et 1 min

Tableau XXXIX : comparaison des valeurs du paramètre L* avant et après traitement à la vapeur à différentes températures et temps

Barème	Avant traitement		Après traitement		F	Valeur p	Brunissement
50 °C, 1 min	77,29	± 1,32	78,44	± 1,32	1,65	0,215	∅
50 °C, 2 min	77,21	± 0,93	78,04	± 0,93	1,24	0,28	∅
50 °C, 3 min	78,39	± 2,27	75,45	± 2,27	4,67	0,04*	∅
55 °C, 30 sec	74,94	± 1,24	74,70	± 1,23	0,08	0,777	∅
55 °C, 1 min	76,71	± 1,49	75,96	± 1,49	0,56	0,464	∅
55 °C, 1,5 min	76,53	± 1,11	77,20	± 1,11	0,82	0,378	∅
55 °C, 2 min	75,21	± 0,79	75,82	± 0,79	1,30	0,270	∅
60 °C, 1 min	75,899	± 1,56	72,20	± 1,56	12,45	0,002*	Oui
60 °C, 2 min	77,8	± 1,35	69,17	± 1,35	89,79	<0,001*	Oui

Les moyennes (n=10) sont données avec leur intervalle de confiance (IC).

*→ différence significative avec $\alpha = 0,05$

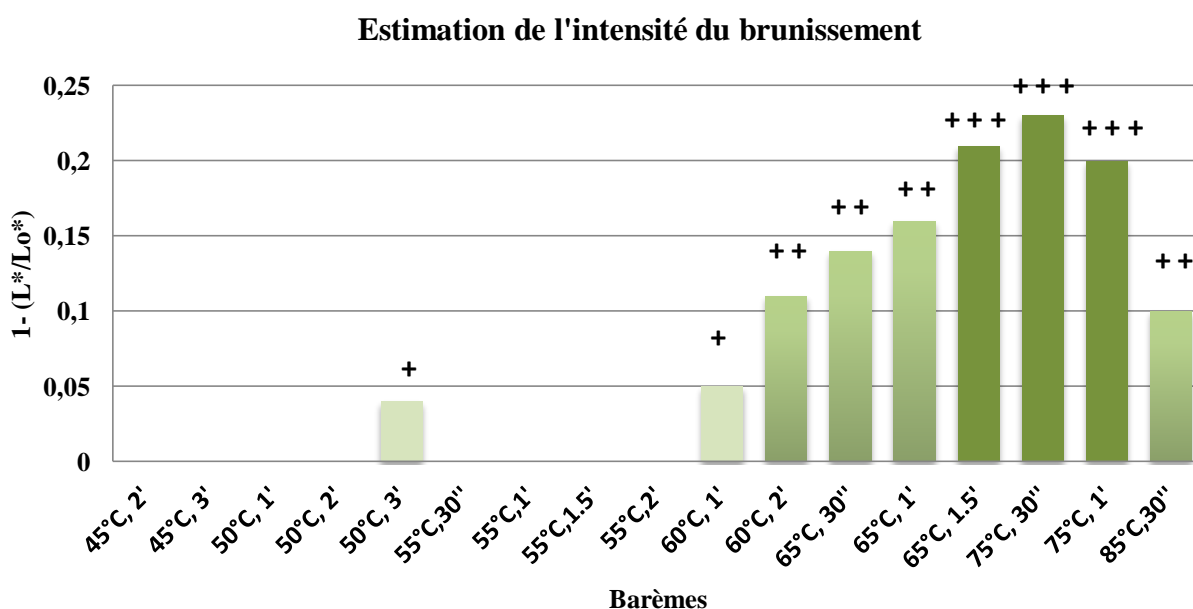
Pour les traitements à 45 °C (2 et 3 min), 50 °C (1 et 2 min) et 55 °C, nous observons une différence non significative ($p > 0,05$) entre les valeurs de L^* avant et après traitement. Ces traitements n'ont donc pas produit de brunissement sur les pommes traitées. Par contre, pour les traitements à 50 °C (3 min) et 60 °C (1, 2 min), les pommes traitées ont brunies légèrement (non-détectable à l'œil nu).

Le rapport L^* après traitement sur L^* initial (L^*/Lo^*) a été calculé afin d'établir une échelle d'intensité du changement de couleur (Tableau XL). Cela a permis de le quantifier et d'appréhender l'influence du barème de traitement (Figure 75). L'intensité du brunissement augmente avec la température d'exposition des pommes et la durée de traitement.

Tableau XL : comparaison de l'intensité du brunissement des différents barèmes de traitement

Barème	Lo^*	L^*	(L^*/Lo^*)	Brunissement
45 °C, 2 min	76,56	77,18	1,00	∅
45 °C, 3 min	78,49	79,27	1,00	∅
50 °C, 1 min	77,29	78,44	1,01	∅
50 °C, 2 min	77,21	78,04	1,01	∅
50 °C, 3 min	78,39	75,45	0,96	+
55 °C, 30 sec	74,94	74,70	1,00	∅
55 °C, 1 min	76,71	75,96	0,99	∅
55 °C, 1,5 min	76,53	77,20	1,01	∅
60 °C, 1 min	75,90	72,20	0,95	+
60 °C, 2 min	77,80	69,17	0,89	++
65 °C, 30 sec	77,54	66,37	0,86	++
65 °C, 1 min	78,35	65,74	0,84	++
65 °C, 1,5 min	78,43	62,05	0,79	+++
75 °C, 30 sec	75,20	60,11	0,77	+++
75 °C, 1 min	78,10	62,51	0,80	+++
85 °C, 30 sec	77,43	69,76	0,90	++

Significativité du brunissement : $0,99 > L^*/Lo^* \geq 0,95 \rightarrow +$; $0,80 \leq L^*/Lo^* < 0,95 \rightarrow ++$; $L^*/Lo^* < 0,80 \rightarrow +++$



Significativité du brunissement : $0,01 < 1 - (L^*/Lo^*) \leq 0,05 \rightarrow +$; $0,20 \geq 1 - (L^*/Lo^*) > 0,05 \rightarrow ++$; $1 - (L^*/Lo^*) > 0,20 \rightarrow +++$

Figure 75 : comparaison de l'intensité du brunissement des différents barèmes de traitement

5.2.4. Effet sur la quantité en polyphénols et la capacité antioxydante de l'épiderme de pomme

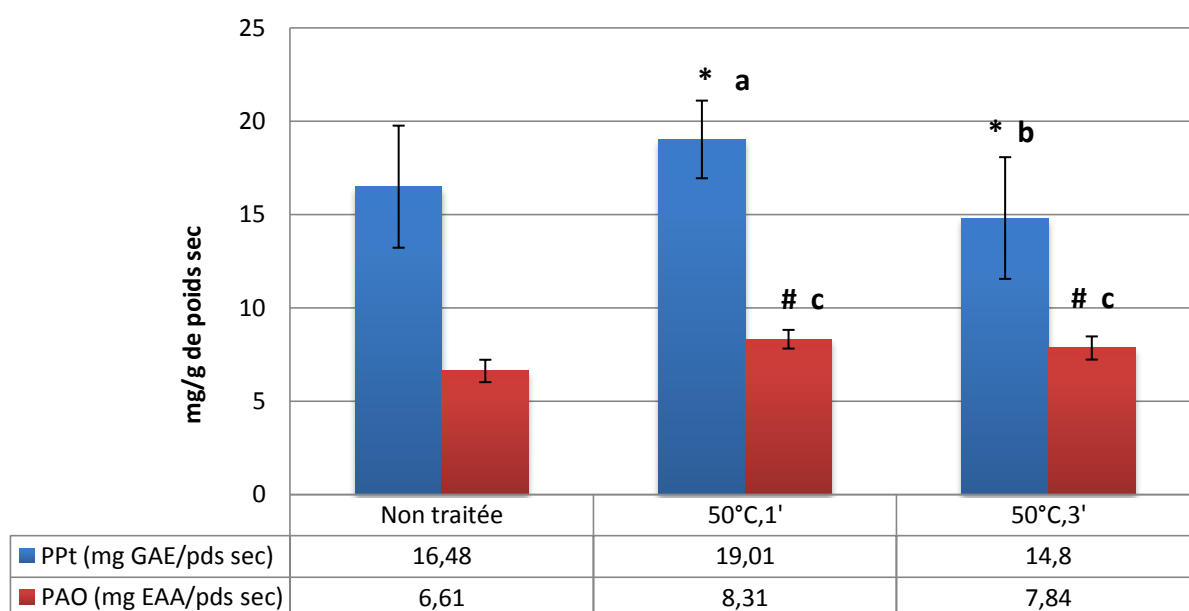
Au cours de nos travaux, deux barèmes de traitement ont été appliqués à des pommes Conventionnelles pour évaluer l'impact du traitement à la vapeur sur les polyphénols et la capacité antioxydante ; [50 °C, 1 min] et [50 °C, 3 min]. Ces deux barèmes ont présenté une efficacité d'assainissement de la levure lors du *Challenge Test* process sans entraîner de brunissement important. Les résultats des dosages de polyphénols et des mesures de capacité antioxydante sont présentés dans le Tableau XLI et la Figure 76.

Tableau XLI : quantification des polyphénols totaux et du pouvoir antioxydant de pommes pour deux traitements

Echantillon	Polyphénols totaux*	Pouvoir antioxydant*
	(mgGAE / g de produit sec)	(mgEAA / g de produit sec)
Pomme non traitée (Témoin)	16,48 ± 3,27 ^a	6,61 ± 0,60 ^d
Traitement 1 (50 °C, 1 min)	19,01 ± 2,08 ^b	8,31 ± 0,50 ^e
Traitement 2 (50 °C, 3min)	14,80 ± 3,26 ^c	7,84 ± 0,62 ^e

* Résultats exprimés en équivalent d'acide ascorbique (EAA) et équivalent d'acide gallique (GAE)

a, b, c, d, e moyennes sont significativement différentes avec $\alpha=0,05$



*Significativité de la différence par rapport au témoin au seuil $\alpha = 0,05$ (polyphénols totaux = PpT)

Significativité de la différence par rapport au témoin au seuil $\alpha = 0,05$ (pouvoir antioxydant = PAO)

a, b, c, d, e moyennes sont significativement différentes avec $\alpha = 0,05$

Figure 76 : suivi de la quantité de polyphénols totaux et du pouvoir antioxydant pour deux traitements

Suite au traitement à 50 °C pendant 1 minute, les dosages montrent une augmentation de la quantité de polyphénols de 15,4 % et une augmentation du pouvoir antioxydant de 25,7 %. Pour le traitement à 50 °C pendant 3 min, une augmentation du pouvoir antioxydant de 18,6 % a été observée. Par contre, les polyphénols totaux ont été réduits de 10,2 %. Ces résultats montrent bien une tendance du traitement à la vapeur (50 °C) à modifier la quantité de polyphénols et le pouvoir antioxydant de l'épiderme de pomme. Barkat and Kadri (2012) ont rapporté une augmentation de teneur en polyphénols lors de la cuisson à la vapeur. L'augmentation des polyphénols totaux est généralement expliquée comme une conséquence de l'action de la température. Cette dernière, en provoquant l'éclatement des cellules, favoriserait leur libération (meilleure disponibilité) et donc une augmentation de leur concentration dans les tissus végétaux (Colin-Henrion, 2008). La variabilité naturelle de la composition en molécules antioxydantes des pommes au sein d'un même lot est également un paramètre à prendre en compte, d'où la nécessité de répéter ces essais sur un effectif plus grand.

5.3. Choix du barème optimal de traitement à la vapeur

En tenant compte des résultats de colorimétrie et de microbiologie, les barèmes de traitement à 55 °C (1 à 2 min) et à 60 °C (1 et 2 min) ont été retenus car présentant un assainissement compris entre 1 et 2 log et un brunissement faible ou nul (Tableau XLI).

Tableau XLII : barèmes optimaux de traitement des pommes

Barème	Assainissement		Impact sur la couleur
	Pourcentage	Log.*	Brunissement
55 °C, 1 min	98,23	1,8 log	Ø
55 °C, 1,5 min	97,6	1,6 log	Ø
55 °C, 2 min	92,6	1,1 log	Ø
60 °C, 1 min	96,27	1,4 log	+
60 °C, 2 min	97,28	1,6 log	++

*Réduction logarithmique

La mise au point de procédés d'assainissement de produits alimentaires destinés à être consommés directement ou à être transformés est un projet vaste car il demande de prendre en compte de nombreux critères. En plus des critères microbiologiques, il faut ajouter les aspects de qualité nutritionnelle et organoleptique. La faisabilité technologique doit également être prise en compte. Pour ce faire, une technologie doit répondre aux exigences d'un cahier de charges, mais aussi assurer un compromis entre les différents processus et la gestion des ressources (énergie, matière...) pour que le procédé soit rentable sur le plan industriel. En matière de désinfection et d'assainissement, les traitements thermiques sont souvent utilisés. En particulier dans le cas des fruits, la tâche est plus délicate car ces derniers sont des produits fragiles.

Ces travaux ont permis d'explorer le traitement à la vapeur (saturée en eau) comme procédé d'assainissement de la surface de pommes. Les résultats obtenus ont montré que la microflore de surface artificielle est sensible à des traitements à la vapeur. Il a été observé dans un premier temps, un effet direct létal dû à la température et dans un second, un effet de lessivage à la surface des pommes dont l'efficacité peut varier avec la température. Avec des traitements à 55 °C, l'efficacité d'assainissement était estimée au minimum à 1 log de réduction. Une réduction maximale de 4 logs a été obtenue à des températures supérieures ou égales à 75 °C. Les pommes ne peuvent cependant pas être portées à des températures au-delà de 65 °C sans qu'il n'y ait d'altération de leurs propriétés organoleptiques. Au regard des résultats colorimétrique des pommes traitées, il est prévu de continuer les essais en ne traitant les pommes qu'à des températures comprises entre 55 °C et 60 °C pendant 1 à 2 min.

Pour déterminer un barème, un suivi de la texture devra également être réalisé. En ce qui concerne l'impact du traitement à la vapeur sur les composés nutritionnels, il a été observé que des traitements à 50 °C pendant 1 à 3 min peuvent modifier la quantité de polyphénols totaux et le pouvoir antioxydant. Pour la suite, il serait intéressant de répéter les dosages des polyphénols et du pouvoir antioxydant pour les barèmes de traitement ciblés plus haut.

Cette étude effectuée sur des levures devra se poursuivre en ciblant cette fois la flore indigène de surface des pommes *Golden Delicious* Conventionnelles et Bio.

Dans le cadre de la mise au point d'une méthode d'assainissement pour un produit biosourcés, nous avons pu mettre en application différentes techniques permettant la maîtrise de la charge microbienne. Comme le produit se présente sous forme de poudre, des adaptations ont dû être réalisées afin de tenir compte de cette nature et ces caractéristiques. Le produit biosourcé en question est un coproduit issu de l'agriculture qui est rapidement valorisé par transformation en poudre. La maîtrise de la charge microbienne est relativement importante dans la mesure où cette matière végétale, à la base sèche, est fortement hygroscopique.

6. Etude de différents procédés assainissants sur des matières premières végétales entrant dans la fabrication de produits biosourcés

Le coproduit étudié est issu de la culture céréalière : la rafle de maïs. Laissé au champ après récolte, il est récupéré pour être transformé en poudre de granulométries différentes : Poudres 1, 2 et 3, ainsi que BR1 et BR2. Ces poudres peuvent être utilisées en cosmétique, dans l'industrie mécanique, en pharmacie, dans l'alimentation animale...

6.1. Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du coproduit

6.1.1. Caractéristiques physico-chimiques et transfert de chaleur

Ces coproduit possèdent des granulométries différentes (selon l'application ciblée) allant de particules de quelques millimètres à la poudre « impalpable » (terme utilisé pour les produits pulvérulents lorsque la granulométrie est tellement fine que l'on ne peut sentir au toucher. Avec ces faibles granulométries, le produit est très compact, la chaleur des traitements pénètre difficilement à cœur avec des phénomènes de convection et conduction lents, augmentant ainsi les temps de traitement (Figure 77). Les répartitions thermiques sont donc hétérogènes entre la poudre se trouvant en périphérie et celle se trouvant au centre du produit traité. Le phénomène de conduction est quant à lui assez limité de par la nature du produit, principalement composé de cellulose.

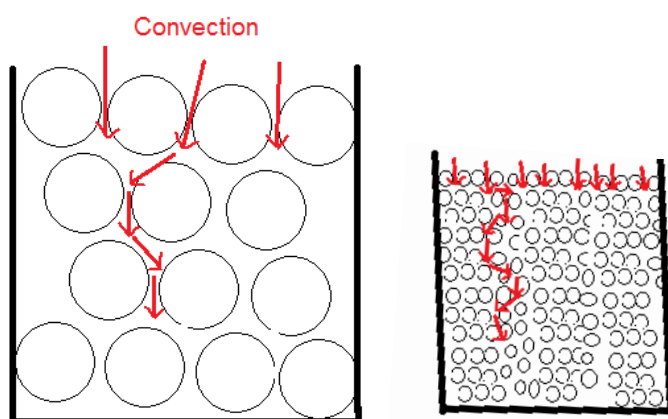


Figure 77 : schéma du phénomène de convection au sein de poudre de granulométries différentes. Le transfert thermique dans la petite granulométrie est plus lent que dans la grosse granulométrie.

6.1.2. Microflore contaminante

Les produits issus de l'agriculture sont propices à une contamination microbienne. Ils le sont d'autant plus s'ils se retrouvent en contact avec l'air et le sol. Les conditions climatiques, notamment le taux d'humidité et la température, favorisent le développement bactérien et/ou fongique. On retrouve principalement les espèces du genre *Bacillus* (sous formes sporulées) pour les bactéries et des *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* pour les champignons (Murrell and Scott, 1966; Wood *et al.*, 2010; Jørgensen *et al.*, 1995; Laroche *et al.*, 2005) (Lund *et al.*, 2000).

6.1.3. Traitements d'assainissement appliqués

Parmi les traitements assainissant, nous avons choisi d'appliquer des traitements :

- thermiques en four (chaleur sèche, vapeur)
- par fumigation d'ozone
- rayonnant électromagnétique par lumière pulsée et UV

6.1.4. adaptation de la méthode de dénombrement

Par rapport à l'aspect physique de cette poudre, nous avons adapté l'étape de malaxage pour l'évaluation de la flore. Une vitesse rapide (graduation 8) a été appliquée. Le maximum de cellules détachées est obtenu après 2 min d'action pour la FAM, alors que pour les champignons le plateau est atteint après environ 3 min d'action (Figure 78). Un temps de 3 min et une vitesse de 8 ont été retenus pour les dénombrements de la flore contaminante de ce produit.

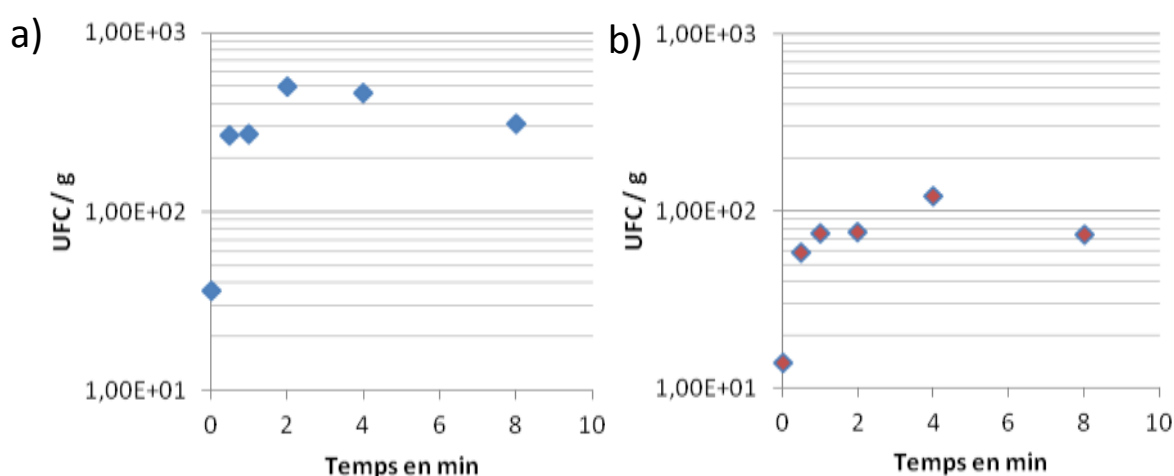


Figure 78 : homogénéisation des micro-organismes en fonction du temps de malaxage au BagMixer. (a) dénombrement de la FAM sur PCA ; (b) Dénombrement des levures / moisissures sur Sabouraud au chloramphénicol ; vitesse de malaxage à 8 (rapide) n=1.

6.1.5. Dénombrements des flores naturelles des Poudres et identification

La FAM et de levures / moisissures des Poudres 1 et 3 ont été dénombrées.

D'après la Figure 79, nous pouvons constater que, pour les poudres 1 et 3, la charge microbienne initiale est similaire aussi bien pour la FAM ($5 \cdot 10^4$ UFC / g) que les levures / moisissures ($1 \cdot 10^4$ UFC / g). Il est à noter que la Poudre 1 contient plus de moisissures que de levures en comparaison avec la Poudre 3 (Figure 80).

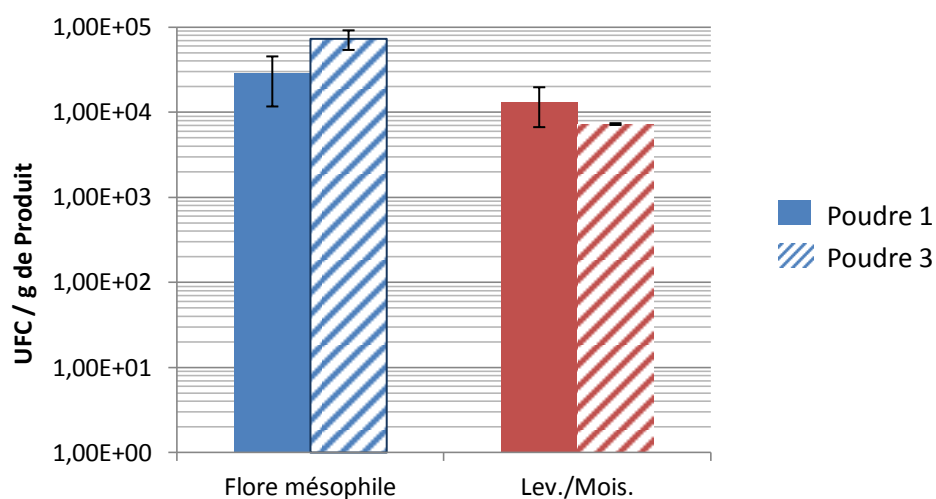


Figure 79 : dénombrements des Poudres 1 et 3 non contaminées. n=3

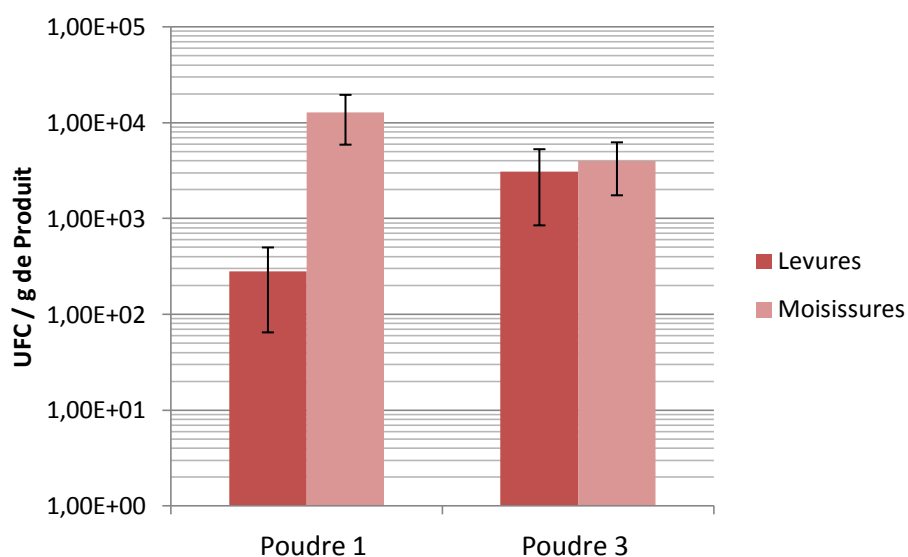


Figure 80 : dénombrements différenciés (levures et moisissures) des Poudres 1 et 3. n=3

Une étude phénotypique des colonies sur PCA montre que la majorité de la flore contaminante initiale est majoritairement représentée par des colonies envahissantes (Annexe VI : Figure 119). Après traitement à 80 °C pendant 10 min, ces colonies sont toujours présentes, probablement des *Bacillus* à l'état sporulé dans les Poudres.

Compte-tenu de ces résultats, le micro-organisme choisi pour notre étude comme « souche test » pour les essais de *Challenge test process* est une bactérie sporulante : *B. subtilis* Marburg 168 à forte capacité de sporulation, non pathogène et naturellement retrouvée dans les produits agricoles (ensilage).

Dans notre cas, la concentration des flores naturellement présentes s'élève à 5.10^4 UFC / g de poudre. Le fabricant des Poudres a par contre observé, selon les lots, des contaminations maximales de $8,5.10^5$ UFC / g. Une contamination artificielle à 10^6 UFC / g permet donc de placer les essais dans les conditions extrêmes retrouvées. Le protocole de contamination pour la réalisation d'un *Challenge test process* a été mis au point :

- La souche *B. subtilis* est cultivée en milieu liquide
- Après 7 jours, la culture est incubée (80 °C ; 10 min) pour détruire les cellules végétatives et sélectionner les spores. La suspension est ensuite centrifugée à 9800 g.
- Le culot cellulaire est lavé puis séché (55 °C ; 4 h)
- Le culot est mélangé par agitation au vortex avec la Poudre 1 pour constituer la poudre contaminante mère à 10^7 UFC / g de poudre.

Cette poudre mère permet de contaminer les Poudres 1, 2 et 3 à 10^6 UFC / g de poudre.

Dans ces conditions, la flore étudiée lors des traitements assainissants est assimilée à la flore contaminante de *B. subtilis*.

6.2. Désinfection thermique

6.2.1. Chaleur sèche

La température du barème est fixée à 175 °C. D'après la Figure 81, la cinétique de montée en température au point critique des deux poudres sont similaires avec un léger retard lors du chauffage et du refroidissement pour le Poudre 3. Ceci peut être attribué à l'aspect physique du produit, plus compact.

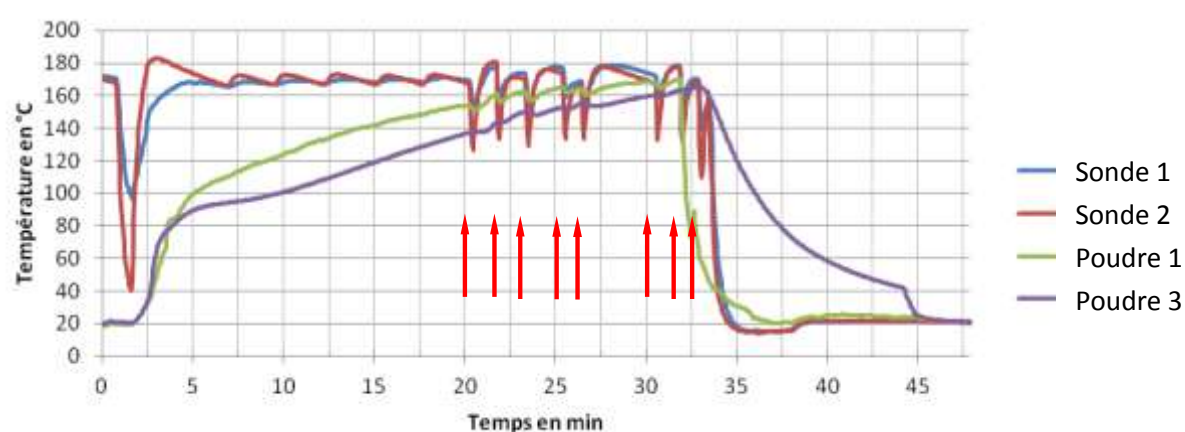


Figure 81 : courbes de suivi de montée en température à cœur des Poudres 1 (vert) et 3 (violet). Les flèches rouges correspondent aux sorties de poudres.

Pour la Poudre 1 (Figure 82), une diminution de charge microbienne est visible dès l'atteinte de 154 °C à cœur. Cette diminution s'intensifie avec un maximum de 3 log à 170 °C. En revanche, pour la Poudre 3 (Figure 83), la destruction des micro-organismes est plus lente. En effet, la montée en

température à cœur a été moins rapide que la Poudre 1. Ceci explique pourquoi les températures de traitement pour les analyses microbiologiques ne sont pas les mêmes. A température identique cependant (165 °C), la perte est similaire pour les 2 types de Poudre.

Lors de ces tests, un brunissement des poudres a été observé visuellement, dû à une incubation trop longue dans le four (montée en température à cœur pas assez rapide ; Figure 81).

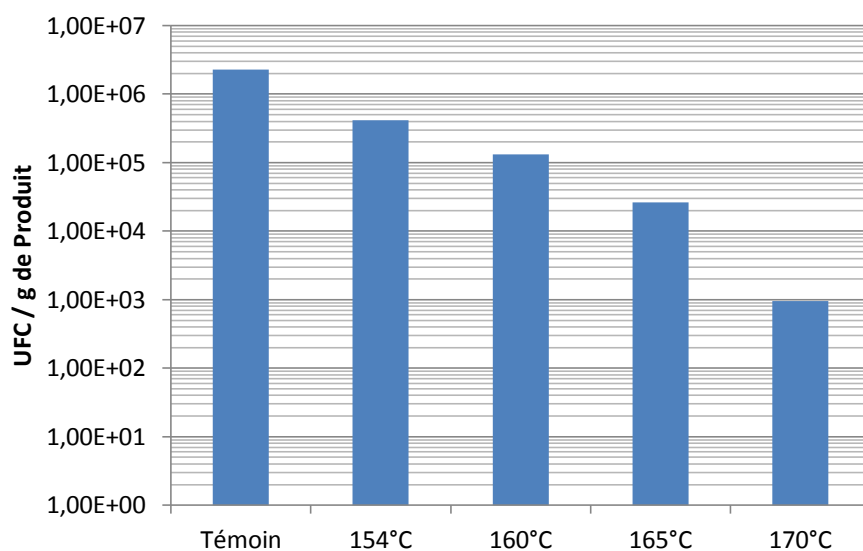


Figure 82 : dénombrement de la FAM au cours d'un traitement par chaleur sèche pour la Poudre 1 à différents paliers de températures.

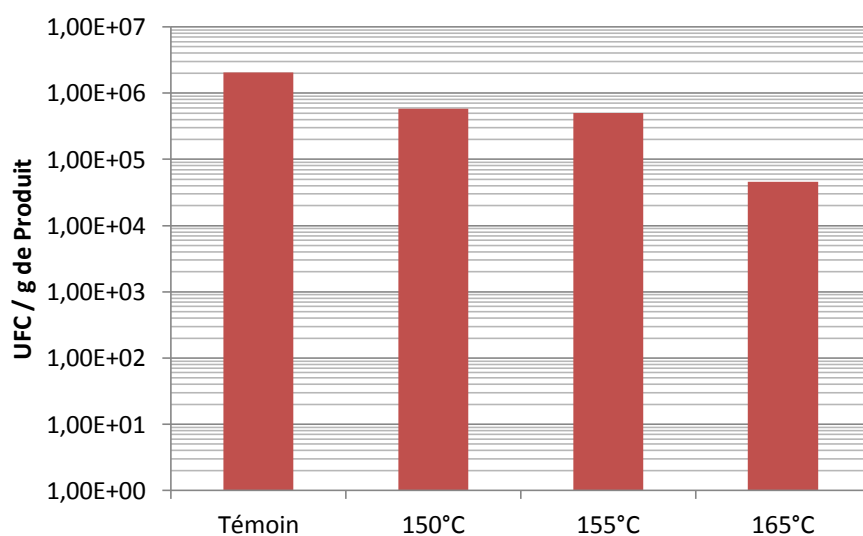


Figure 83 : dénombrement de la FAM au cours d'un traitement par chaleur sèche pour la Poudre 3 à différentes températures.

Pour l'essai suivant, seule la Poudre 2 a été retenue (granulométrie intermédiaire aux Poudres 1 et 3). Pour limiter le brunissement, la désinfection de la Poudre 2 a été réalisée au four en augmentant la température par palier de 5 °C tout en gardant un delta de température de 20 °C entre le four (courbe bleu) et la Poudre 2 à cœur (courbe rouge) (Figure 84).

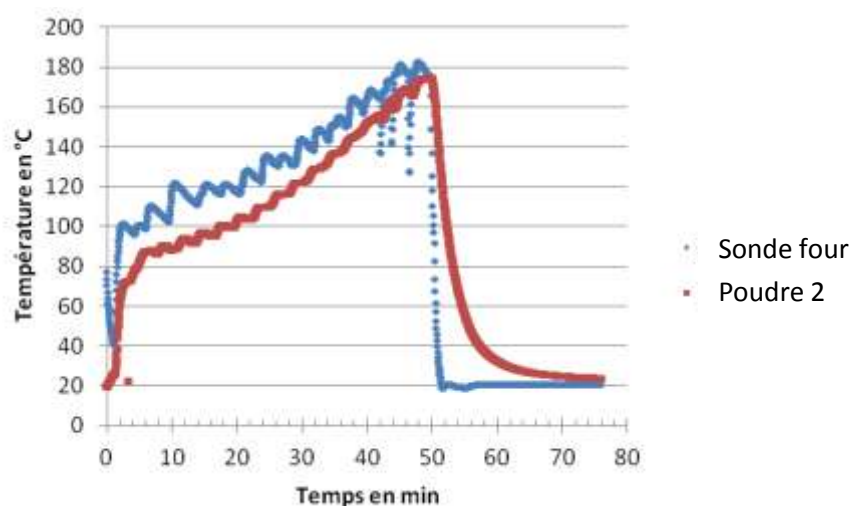


Figure 84 : suivi des températures dans le four (en bleu) et à l'intérieur de la poudre (en rouge) lors du traitement par chaleur sèche de la Poudre 2 (montée en température progressive)

Les résultats microbiologiques obtenus sont similaires à ceux des Poudres 1 et 3. La diminution de la charge microbienne à une température de 170 °C atteinte est légèrement supérieure à 3 logs. Cette diminution microbienne est d'autant plus importante que la température atteinte à cœur est élevée (Figure 85). Par contre, en ce qui concerne la diminution du brunissement, aucun effet n'est obtenu. Il est toujours présent malgré la montée plus douce en température (four et à cœur) (Figure 84).

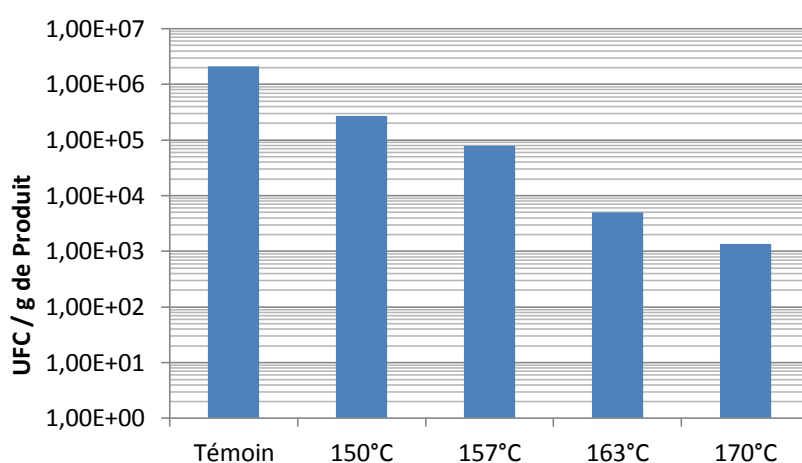


Figure 85 : dénombrement de la FAM au cours d'un traitement par chaleur sèche pour la Poudre 2 à différentes de températures. Les temps de traitements dépendent du temps pour atteindre la température indiquée (cf. Figure 82).

Le traitement thermique au four permet dans les conditions testées des abattements jusqu'à 3 logs de la FAM assimilée ici à la forme sporulée de *B. subtilis*. Les résultats sur la Poudre 2 sont satisfaisants d'un point de vue microbiologie. En revanche, les réactions de brunissement et la diminution de la teneur en eau des Poudres (< 3 % ; résultats non montrés) ne sont pas favorables à l'utilisation de ce procédé.

6.2.2. Désinfection de la Poudre 3 : chaleur sèche et vapeur à 150 °C

Les essais ont été réalisés pour limiter le brunissement à un seuil acceptable à une température de 150 °C en chaleur sèche ou vapeur. La Poudre 3 a été retenue pour cet essai car il présente plus de contraintes de transferts thermiques à cœur (Figure 81). D'après les résultats précédents, le brunissement du produit survenu après 30 min est jugé inacceptable.

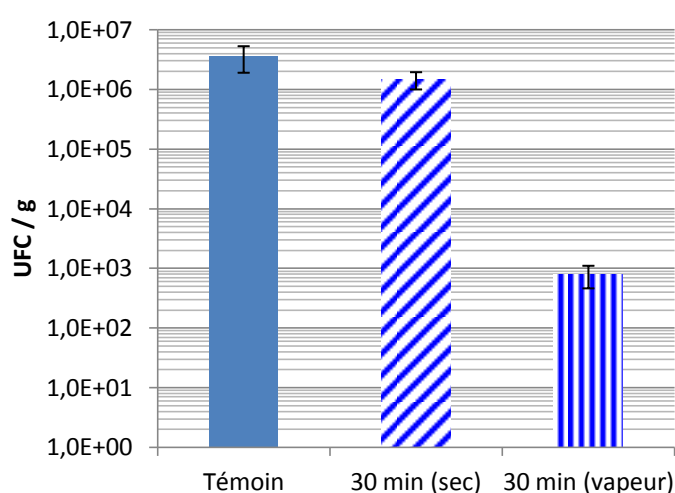


Figure 86 : effet du traitement à la chaleur sèche ou humide sur la survie de *B. subtilis* de la Poudre 3.

Le traitement par chaleur sèche de 30 min (Figure 86) n'a pas d'effet significatif sur la désinfection de BS. En revanche, une réduction de 3,7 logs est observée pour le traitement à la vapeur. L'une des hypothèses serait que les molécules d'eau permettraient d'accélérer la cinétique de montée en température (Figure 87).

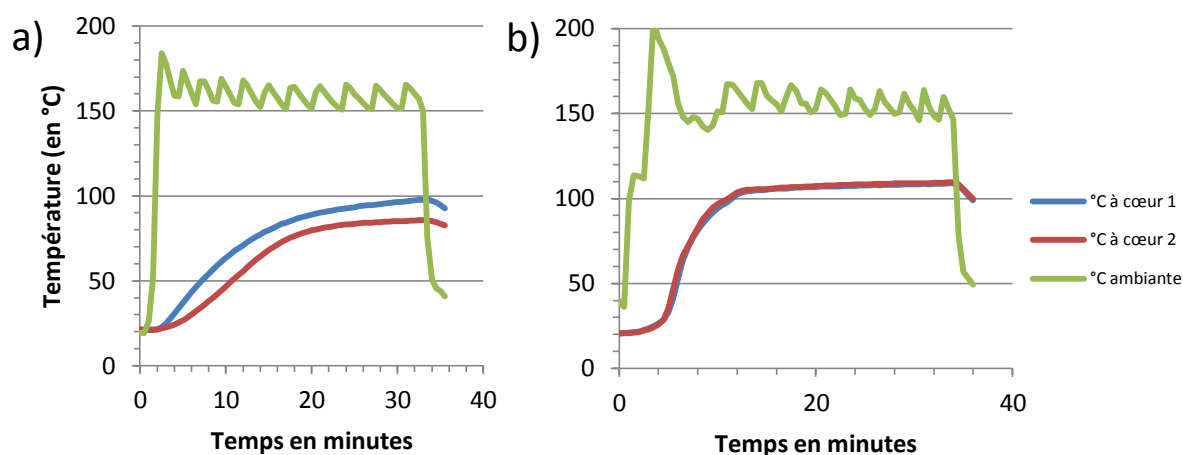


Figure 87 : suivi des températures lors d'un traitement par chaleur sèche ou humide à 150 °C dans l'ambiance du four et à cœur des Poudres 1 et 2 : a) chaleur sèche, b) chaleur humide.

Le traitement vapeur est le plus efficace à la vue des résultats microbiologiques (Figure 86). Nous n'avons pas observé de modification de la teneur en eau ni de brunissement au cours de ces traitements (résultats non montrés).

Afin d'assainir l'intégralité des Poudres, nous avons décidé de traiter le coproduit en amont de son process de transformation par broyage (BR1 et BR2). En traitant à ces étapes de transformation, la totalité de la gamme de produit sera assainit.

6.2.3. Désinfection de BR1 et BR2 par chaleur sèche et vapeur

Nous avons constaté que la montée en température à cœur est d'autant plus difficile que la granulométrie est fine. Un traitement assainissant avant broyage permettrait donc de s'affranchir des problèmes de granulométrie des poudres. Nous nous attendons donc à obtenir des efficacités d'assainissement supérieures ou égales à celles obtenues avec la Poudre 1.

Deux traitements ont été réalisés :

- 1) Traitement de 30 min à 150°C – humidité 100 % (Figure 88)
- 2) Traitement de 40 min à 2 phases : 30 min à 150°C – vapeur 100% puis 10 min à 150 °C, humidité 14 % (ce traitement séquentiel a pour but de conserver la teneur en eau du produit original ; entre 6 et 14 %) (Figure 89)

Les suivis de températures à cœur sont effectués, dans un premier temps, pour définir le traitement qui assure une montée en température la plus rapide. Dans un second temps, des analyses colorimétriques sont réalisées afin de valider le brunissement ou non du produit. Enfin des analyses microbiologiques nous ont permis de définir l'efficacité des traitements.

6.2.3.1. Suivi des températures à cœur

1) Traitement à 150°C pendant 30 min – humidité 100 %

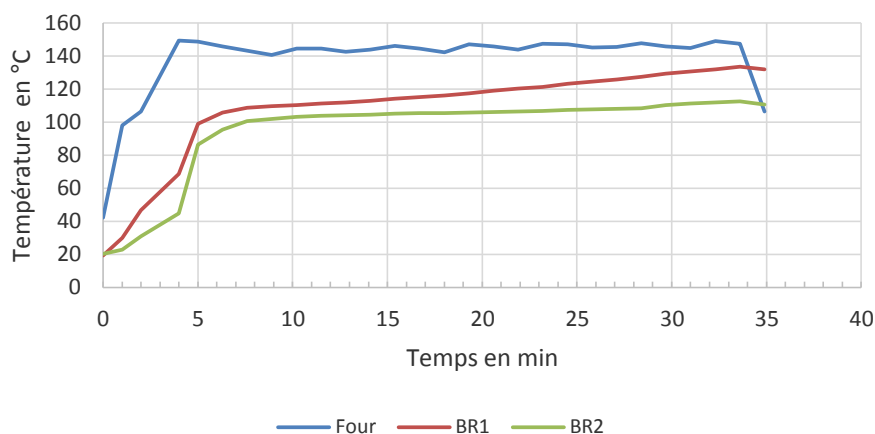


Figure 88 : suivi des températures dans l'ambiance du four et au cœur du produit BR1 et BR2 lors d'un traitement de 30 min en chaleur humide

2) Traitement à 2 phases ; 150 °C ; 40 minutes

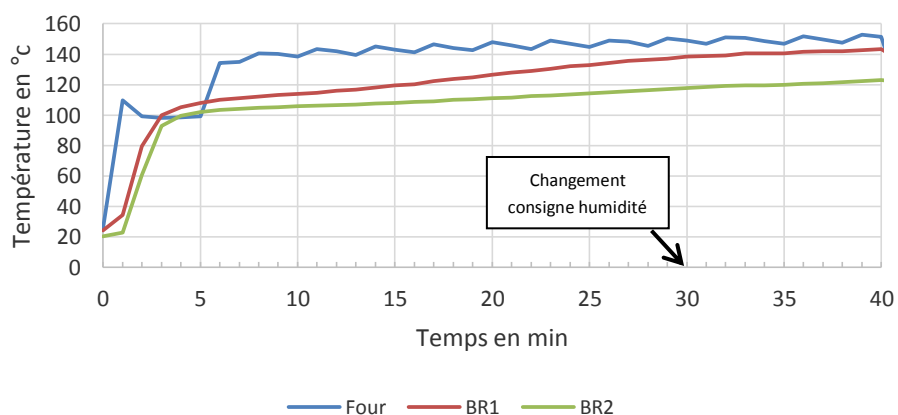


Figure 89 : suivi des températures dans l'ambiance du four et au cœur du produit BR1 et BR2 lors d'un traitement de 30 min en chaleur humide avec séchage final de 10 min à 150°C (la température du four reste bloquée à 100 °C pendant 4 min à cause d'une déconnection accidentelle de la sonde de mesure)

Quel que soit le type d'essai et d'échantillon, on observe deux phases dans la montée en température :

- Une phase de montée en température rapide jusqu'à 100 °C environ
- Une phase lente jusqu'à la température de consigne

La montée en température est plus rapide en présence de vapeur d'eau dans le four.

6.2.3.2. Effet des traitements sur la coloration des produits

La teinte et la saturation ont été calculées à partir des valeurs L, a et b reportées dans le Tableau XLIII.

Tableau XLIII : valeur colorimétrique L, a et b et variation de la teinte et de la saturation

		L	a	b	Teinte	Variation Teinte (%)	Saturation	Variation Saturation (%)
BR1	Référence	70,3	3,73	14,49	75,56	0,0	14,96	0,0
	30 min	62,8	5,49	15,94	71	6,0	16,86	12,7
	40 min	59,7	6,13	16,46	69,57	7,9	17,56	17,4
		L	a	b	Teinte	Variation teinte (%)	Saturation	Variation Saturation (%)
BR2	Référence	70,46	6,41	17,3	69,67	0,0	18,45	0,0
	30 min	67,69	7,65	18,55	67,59	3,0	20,07	8,8
	40 min	68,48	7,56	19,15	68,45	1,8	20,59	11,6

Ces résultats permettent de comparer les échantillons entre eux et de qualifier numériquement les perceptions visuelles. Ici, les variations de teinte sont faibles pour les échantillons traités à la chaleur (inférieur à 7,9 % dans le pire des cas). L'hétérogénéité des particules au sein même des produits et l'absence de relation entre la teinte et la durée du traitement indique que ces variations ne sont pas significatives. Pour la saturation, on observe une augmentation des valeurs en fonction du temps de traitement. Cette différence se traduit visuellement par un léger brunissement du produit (Diminution des valeurs de L).

6.2.3.3. Etude microbiologique

L'étude microbiologique des produits BR1 et BR2 a montré qu'ils étaient naturellement contaminés en flores FAM et levures / moisissures à des charges supérieures à 10^6 UFC / g pour BR1 et supérieures à 5.10^5 UFC / g pour BR2 (résultats non montrés). De ce fait, nous n'avons pas jugé nécessaire de réaliser de *Challenge test* sur ces 2 produits dans la mesure où nous estimons les

charges microbiennes suffisantes pour étudier la réduction de la flore présente (ce qui n'était pas le cas des Poudres 1, 2 et 3 ; lots différents).

Les analyses microbiologiques de la FAM et des levures / moisissures ont été effectuées dans les mêmes conditions que les 2 traitements de 30 et 40 min précédent.

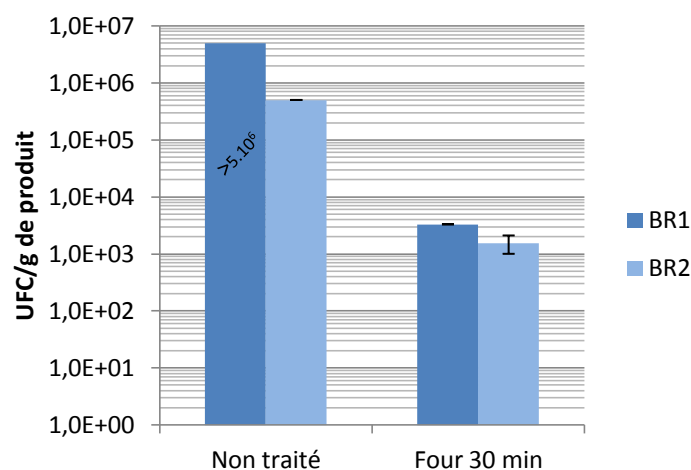


Figure 90 : dénombrement de la FAM après traitements par chaleur humide contrôler pour les produits BR1 et BR2

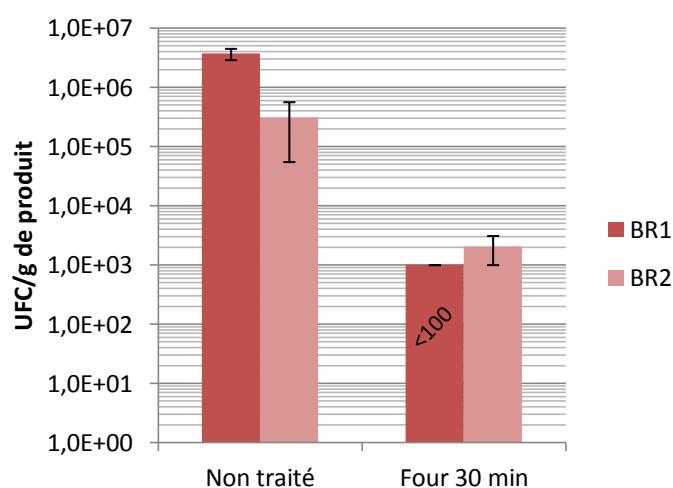


Figure 91 : dénombrement des levures et moisissures après traitements par chaleur humide pour les produits BR1 et BR2

Les résultats de dénombrement montrent qu'avec le traitement de 30 min vapeur à 150 °C, une réduction importante, aussi bien de la FAM (Figure 90) que des levures / moisissures (Figure 91), est obtenue. L'efficacité du traitement est proportionnelle à la durée du traitement.

Pour le traitement de 40 min (Figure 92), nous rappelons qu'il est à deux phases dans le but de conserver la teneur en eau originale du produit (résultats non montrés).

Dénombrement du BR1 et du BR2 avant et après traitement à 2 phases

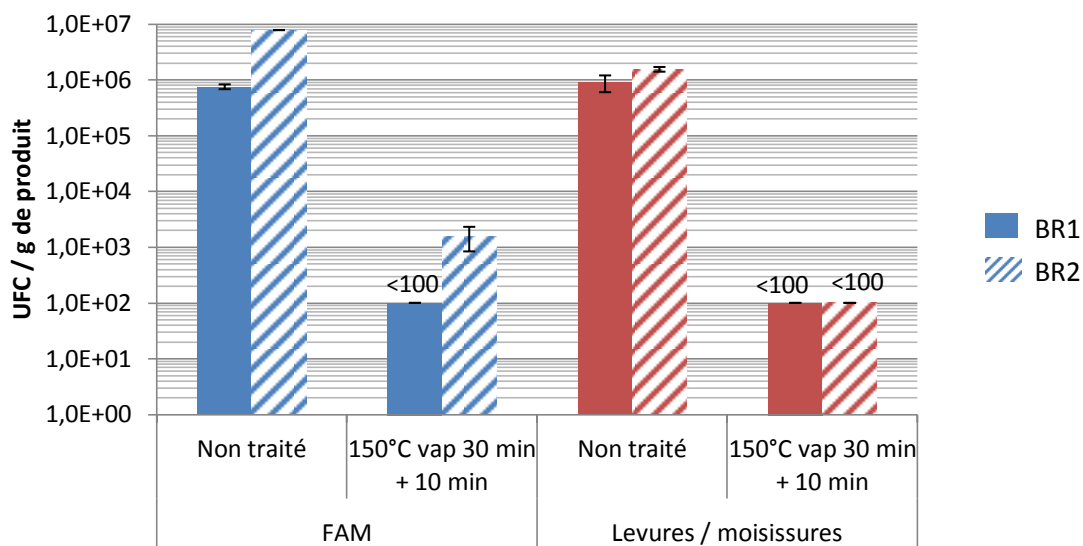


Figure 92 : résultats de dénombrement des échantillons de BR1 et BR2 traités 40 min à 150 °C avec 2 phases (30 min humidité 100 % puis séché 10 min avec humidité 14 % ; 150°C)

Pour les levures et moisissures, on observe pour BR1 et BR2 une réduction microbienne supérieure à 4 logarithmes avec atteintes des seuils de détection. Pour BR1, la FAM atteint le seuil de détection (100 UFC / g de produit). En revanche, pour le BR2, la réduction approche les 4 logs.

Le produit BR2 est hétérogène dans sa composition. Il est composé de granulats et de flocons. Ils peuvent être séparés grâce à un tamisage à 2,0 mm :

- > 2,0 mm : Granulat (utilisé pour la fabrication des Poudres 1, 2 et 3)
- < 2,0 mm : Flocon

Une étude microbiologique différenciée du Granulat et du Flocon a été effectuée afin d'apprécier laquelle des composantes du BR2 est potentiellement la plus chargée. Une fois le produit (BR2) traité, le Flocon et le Granulat ont été séparés par tamisage (condition aseptique) à 2,0 mm (Retsch AS 200, Allemagne).

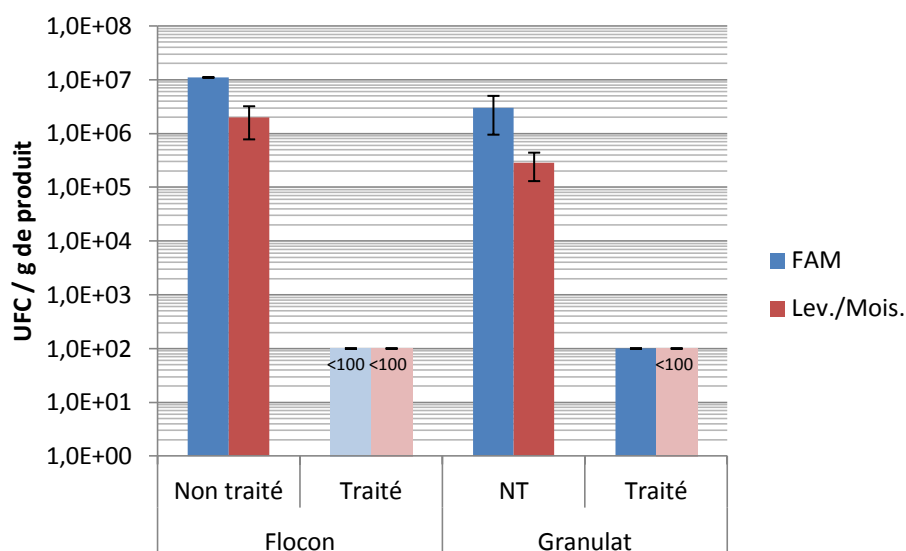


Figure 93 : résultats de dénombrement avant traitement (NT) et après traitement des fractions BR2 différenciées en Flocon et Granulat ; 40 min à 150 °C avec 2 phases (30 min humidité 100 % puis séché 10 min avec humidité 14 % ; 150°C) (n=3).

Le traitement thermique a permis d'obtenir des réductions logarithmiques supérieures à 4 pour le Flocon ainsi que pour le Granulat (FAM et levures / moisissures) (Figure 93). On remarquera cependant que le Flocon est légèrement plus contaminé que le Granulat aussi bien pour les levures / moisissures que pour la FAM.

Ce traitement efficace à 2 phases affecte légèrement la couleur du produit (brunissement). Une montée en température du produit à cœur plus rapide que dans les essais pourrait limiter ce phénomène. Un appareil avec un système de brassage permettrait d'augmenter la vitesse de montée en température et assurerait une meilleure homogénéisation du traitement : vis chauffante ou four rotatif.

6.2.4. Test de traitement thermique par autoclavage

Dans les essais suivants, nous avons de nouveau étudié l'efficacité des traitements en condition de *Challenge Test* sur les Poudres 1, 2 et 3.

La poudre 3 est conditionnée dans un récipient hermétique sous vide de 250 mL permettant de maintenir son humidité. L'air est chassé du récipient pour permettre de meilleurs transferts de chaleur par convection. La Figure 94 montre le suivi des températures à l'intérieur de l'autoclave, au cœur de la Poudre 3 à l'aide de sonde embarquée et le suivi de pression à l'intérieur de l'autoclave.

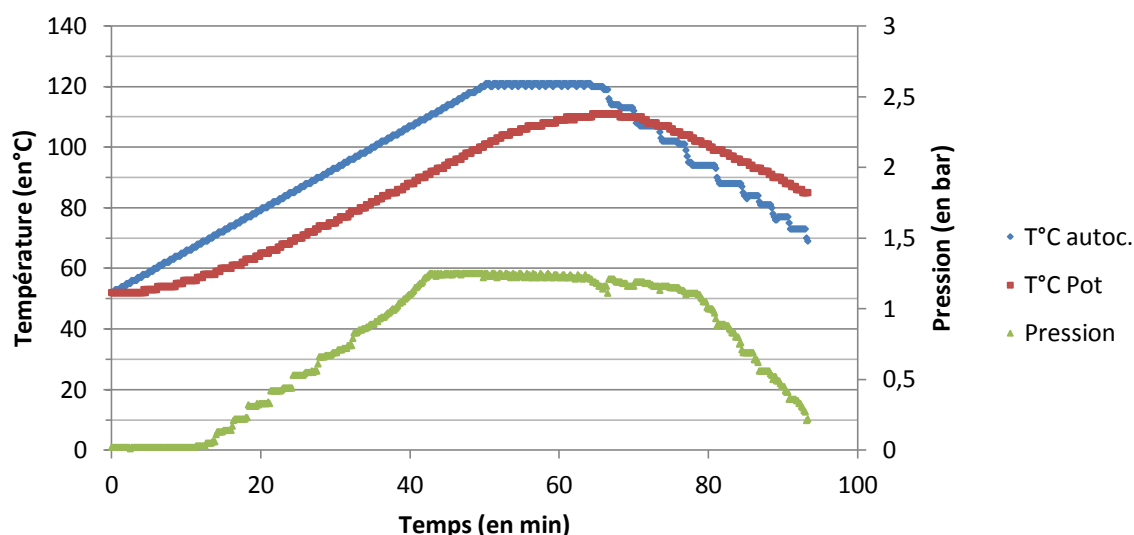


Figure 94 : courbe de suivi des températures et de pression lors du traitement par autoclave à eau de la Poudre 3.

Avec la sonde à cœur, nous avons pu suivre l'évolution de la température. La poudre 3 et l'autoclave ont été préchauffés à une température de 50 °C (10 min). La transmission de chaleur à cœur est assez rapide avec une différence de 20 °C par rapport à la température de l'enceinte de l'autoclave. Cette latence n'a pas permis au produit d'atteindre la température du barème de 15 min à 121 °C mais un maximum de 110 °C. Cependant, l'assainissement est important - au moins 4 logs. Les seuils de détection pour la FAM (<100 UFC / g) et les levures / moisissures ont été atteints (<10 UFC / g) (Tableau XLIV).

Tableau XLIV : résultats des dénombrements des flores mésophiles aérobies et des flores fongiques avant et après traitement par autoclave, pallier à 121 °C pendant 15 min.

	Flore mésophile aérobie (assimilée <i>B. subtilis</i>)			Levures / moisissures		
	Avant traitement	Après traitement	Réduction microbienne en log	Avant traitement	Après traitement	Réduction microbienne en log
Poudre 2	$2,3 \cdot 10^6$ UFC/g	<100	>4,36	$2,0 \cdot 10^3$ UFC/g	<10	>2,30
Poudre 3	$1,9 \cdot 10^6$ UFC/g	<100	>4,28	$6,0 \cdot 10^3$ UFC/g	<10	>2,78

L'efficacité du traitement à l'autoclave est supérieure aux traitements thermiques au four. Ce traitement a permis de diminuer les températures à cœur. Ici, la température maximale atteinte au cœur du produit a été de 110°C. Par conséquent, aucun brunissement du produit n'est décelable (Annexe VI : Figure 120 et Figure 121). En contrepartie, ce traitement est plus long et dure jusqu'à 90 min.

Cependant, le traitement par autoclave est difficile à mettre en œuvre dans une industrie travaillant à flux tendu. Le travail en *Batch* et la durée du traitement ne permettent pas de hauts rendements. De plus, ce système est coûteux en énergie (électrique ou gaz naturel).

6.3. Traitement à l'ozone gazeux

L'ozone est une technologie de choix pour le traitement des agro-ressources. Il est déjà utilisé dans l'industrie du blé avec le système Oxygreen qui permet l'assainissement des céréales (Dubois *et al.*, 2006). Nous avons étudié plusieurs temps d'exposition à l'ozone (1 min, 5 min, 10 min et 20 min) dans un réacteur contenant 250 g des Poudres 1, 2 ou 3 contaminées artificiellement par *B. subtilis* (spores).

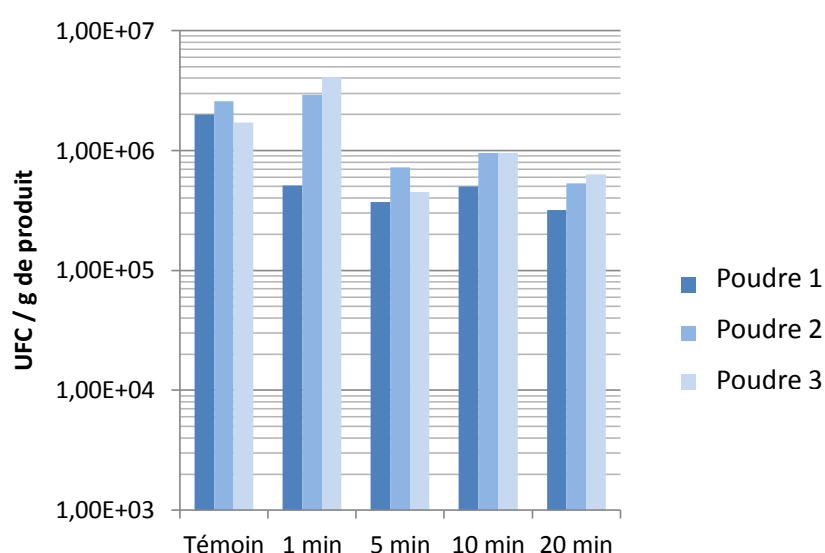


Figure 95 : dénombrements de la FAM (assimilée *B. subtilis*) pour différents temps de traitement à l'ozone à 45 g/h pour les poudres 1, 2 et 3 contaminées

Après 20 min de traitement (Figure 95), la diminution maximale obtenue pour la FAM s'approche d'un log pour la Poudre 1. Cette évolution est obtenue dès les premières minutes de traitement. Pour les Poudres 2 et 3, cette diminution est plus faible avec une diminution d'environ 0,5 log.

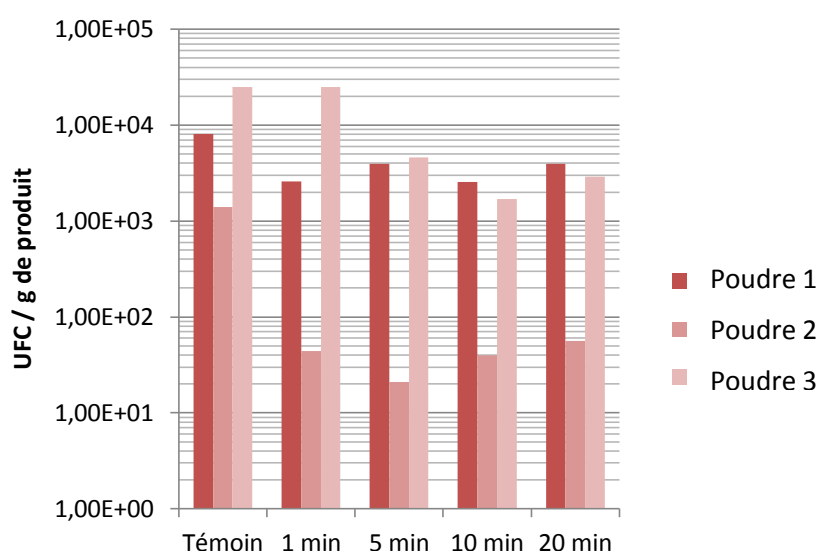


Figure 96 : dénombrements des levures et des moisissures pour différents temps de traitement à l’ozone à 45 g/h pour les poudres 1, 2 et 3 contaminées

L’efficacité du traitement est différente selon la Poudre dans le cas des levures et moisissures (Figure 96). Pour la Poudre 1, aucune diminution n’est pas décelable alors qu’elle approche le log pour la Poudre 3. En revanche, pour la Poudre 2, cette diminution de charge fongique est supérieure à 1 log, soit plus de 90 % des champignons inactivés. Ces différences peuvent être dues aux sensibilités à l’ozone des espèces fongiques naturellement présentes dans les Poudres.

Dans la suite de l’étude, nous nous sommes intéressés à l’impact des traitements électromagnétiques sur la désinfection des poudres.

6.4. Traitement par rayonnements électromagnétiques

6.4.1. Irradiation aux UV

Nous avons traité des petites quantités (environ 5 g) de Poudres 1, 2 et 3 artificiellement contaminées par des spores de *B. subtilis* en réalisant une monocouche de poudre dans l’enceinte de traitement.

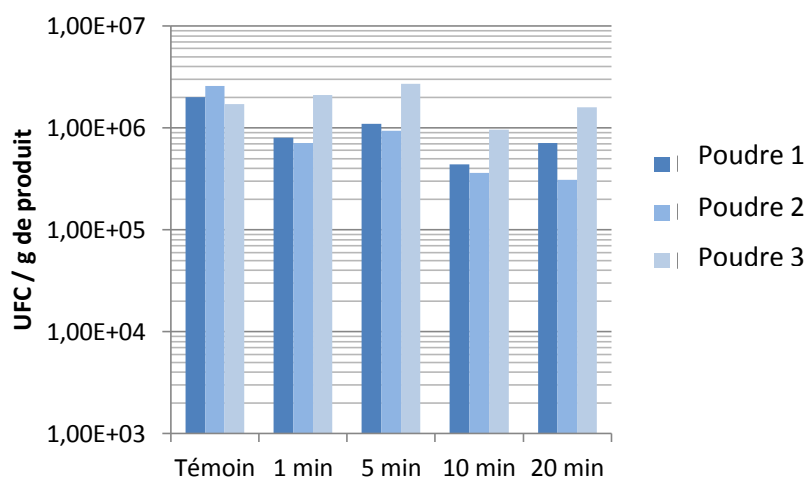


Figure 97: dénombrements de la FAM pour différents temps de traitement aux UV pour les Poudres 1, 2 et 3 contaminées

Les résultats de dénombrement après irradiation aux UV ne montrent pas de diminution de la FAM pour les échantillons de la Poudre 3 (Figure 97). Pour les Poudres 1 et 2, les diminutions de flore atteignent quasiment 1 log par rapport au témoin non traité.

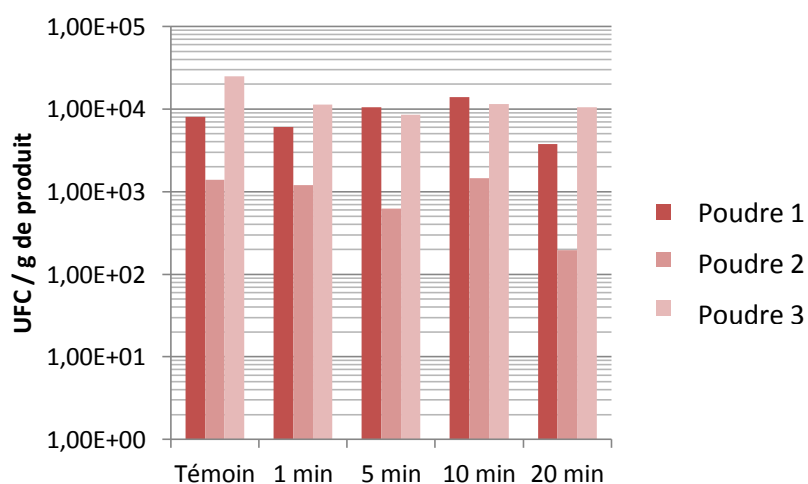


Figure 98 : dénombrements des levures et des moisissures pour différents temps de traitement aux UV pour les Poudres 1, 2 et 3 contaminées

Pour les dénombrements des levures et des moisissures (Figure 98), les effets sont quasi-similaires à ceux observés pour la FAM avec aucune diminution apparente pour les Poudres 1 et 3 alors que la réduction est proche d'un log pour le Poudre 2.

Dans ces essais d'irradiation, les faibles réductions en microorganismes peuvent être dues à un phénomène de « zone d'ombre », c'est-à-dire que le rayonnement UV a du mal à pénétrer la matière. L'augmentation de la dose d'irradiation ne résout le problème que partiellement. Un traitement électromagnétique plus pénétrant pourrait éventuellement supprimer ce phénomène. Nous avons donc ensuite testé des irradiations par la lumière pulsée.

6.4.2. Traitement par lumière pulsée

La lumière pulsée est une technologie basée sur un flash lumineux très intense qui couvre les longueurs d'onde de 200 nm (Ultra-Violet) à 1 mm (Infra-Rouge). Dans cette étude, nous avons dû trouver un contenant hermétique qui laisse passer un maximum de lumière. Nous avons donc testé plusieurs types de film plastique à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Biochrom Libra, Angleterre). Le choix du matériau des sachets a dû se faire en fonction des capacités de celui-ci à laisser passer les rayonnements de la lumière pulsée (Figure 99).

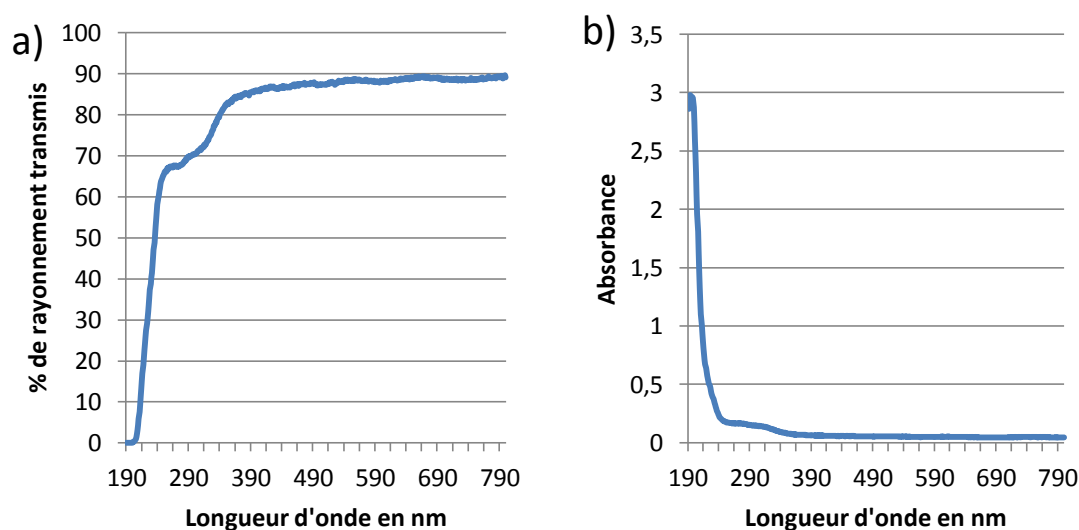


Figure 99 : a) pourcentage de rayonnement transmis à travers le film ; b) absorbance du film

Ces résultats montrent que le film est compatible avec le traitement à la lumière pulsée, bien qu'une perte de transmission soit observée en dessous des 250 nm. De plus, cette diminution de transmission ne se situe pas dans le spectre germicide de la lumière pulsée ; de 250 nm à 400 nm. L'utilisation de ce film (sachet hermétique) est indispensable pour éviter la dissémination des spores de *B. subtilis*.

Les dénombrements microbiens ont été réalisés sur les Poudres 1, 2 et 3 traitées par une dose ou 3 doses identiques répétées (1 dose = un flash). Pour la Poudre 2, 3 épaisseurs ont été testées ; < 5mm, environ 25 mm et environ 35 mm.

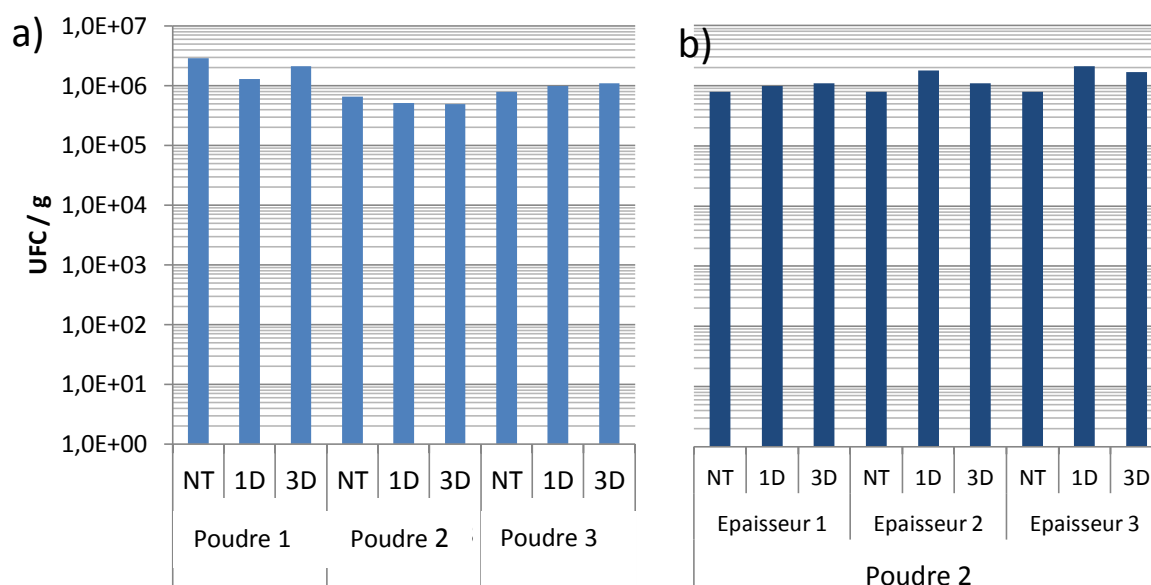


Figure 100 : résultat de dénombrements de la flore mésophile aérobie après traitement à la lumière pulsée ; a) 3 types de Poudre 1, 2 et 3 avec 1 ou 3 doses ; b) Poudre 2 avec 3 épaisseurs différentes

Les résultats ne montrent aucun effet significatif de la lumière pulsée sur les réductions logarithmiques de *B. subtilis* (Figure 100). L'efficacité pour les levures et moisissures est identique à la FAM.

La lumière pulsée, selon conditions de traitement, est efficace sur *B. subtilis* (Levy *et al.*, 2011). L'inefficacité de ce traitement peut venir de la structure même des Poudres et du fait que la bactérie soit sous forme sporulée.

Pour mieux connaître la structure physique des Poudres, nous avons réalisé une étude par microscopie électronique. Nous avons pu voir les Poudres possédaient de très nombreuses anfractuosités (Figure 101). Celles-ci sont de l'ordre de la dizaine de micromètre pour les plus petites. L'hypothèse selon laquelle les microorganismes, dans notre cas *B. subtilis*, se répartiraient dans ces interstices est tout à fait plausible. Les rayonnements photoniques, absorbés par le produit, n'atteignent donc pas ces microorganismes. Ce phénomène est appelé « zone d'ombre » (ou phénomène d'écran) et se produit également pour le traitement aux UV. Par ailleurs, il peut également expliquer l'inefficacité des traitements gazeux à l'ozone qui ne pénétrerait pas suffisamment les cavités.

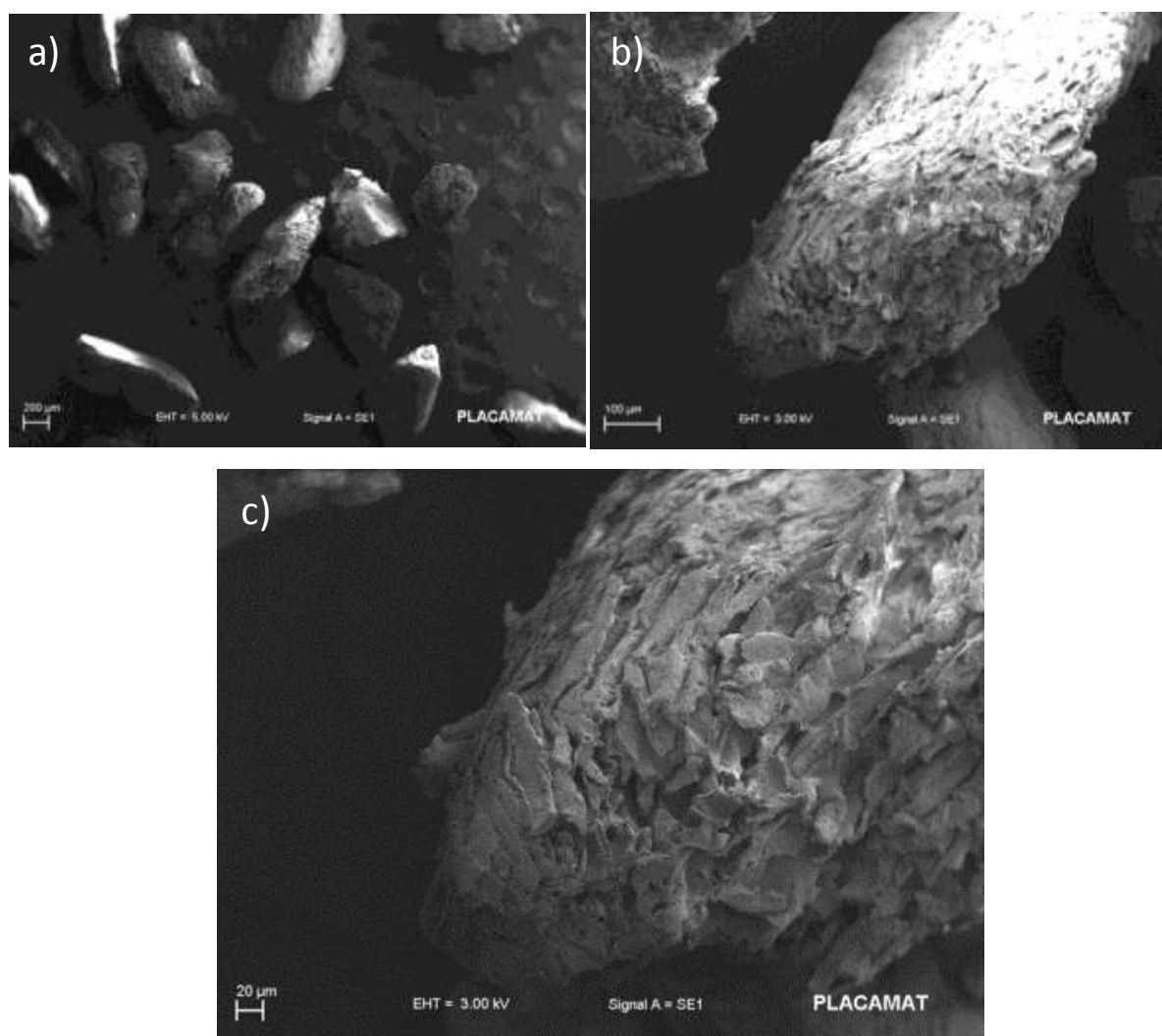


Figure 101 : photos en microscopie électronique à balayage de la Poudre 2 à l'agrandissement a) X 200 ; b) X 500 ; c) X 2000

Dans cette étude d'assainissement des coproduits, nous avons tout d'abord quantifié et identifié le type de flore présent sur le produit à l'état naturel. Il a été mis en évidence que les taux de contamination microbienne pour la FAM et pour les levures / moisissures sont similaires. Nous avons mis en évidence que la FAM est principalement constituée de micro-organismes sous forme sporulée. Ainsi, *B. subtilis* Marburg 168 a été choisi comme souche pour les *Challenge Test*. La contamination des échantillons a été fixée à une charge minimale de 10^6 UFC / g de Produit, cette charge correspond à une contamination importante qu'il est possible de rencontrer.

Les tests de désinfection aux UV et à l'ozone n'ont permis d'obtenir dans le meilleur des cas que des réductions de charges microbiennes proches de 1 log. Bien que ces traitements conservent parfaitement la qualité des produits (aucun brunissement ni changement d'hygrométrie du produit ; résultats non montrés), cette réduction n'est pas suffisante. L'utilisation de la lumière pulsée n'a pas d'effets perceptibles sur la décontamination des Poudres contaminées.

Les traitements thermiques ont obtenus les meilleures efficacités. La méthode par autoclavage à permis d'obtenir de très bons résultats avec une décontamination complète (seuil de détection atteint) du produit dans les conditions testées. La diminution de flore a été supérieure ou égale à 4 logs. Cependant, ce type de technologie est particulièrement difficile à mettre en place pour un traitement en continu du produit avec les contraintes qu'implique les technologies sous pression (enceinte hermétique), les temps de traitement (montée en température et refroidissement) et le coût élevé.

Enfin, les désinfections par chaleur sèche ou par vapeur ont également été efficaces. Elles ont l'inconvénient de modifier les caractères physiques du coproduit, avec selon les conditions, un brunissement plus ou moins marqué. Cependant, les décroissances microbiennes sont relativement proches des 4 logs avec pour la désinfection vapeur à 150 °C une diminution de 3,7 logs sur la Poudre 3 qui est la plus contraignantes. Ces essais de désinfections thermiques ont été réalisés en condition statique ne permettant pas une montée en température rapide. En traitant avec un four rotatif ou une vis chauffante, la convection et conduction seront plus homogènes ce qui limitera la durée du traitement et donc l'impact sur le produit.

Le traitement thermique à la vapeur est la seule des techniques testées qui diminue la charge microbienne de 4 logs. La désinfection en amont des broyages (BR1 et BR2) permet une efficacité plus importante avec de meilleurs transferts thermiques.

7. Technique de désinfection à l'ozone.

7.1. Elaboration du pilote

Pour les travaux de cette thèse, nous avons opté pour un système permettant une production d'eau ozonée pour le traitement des fruits et légumes avant stockage ou avant transformation. Le système de production d'ozone que nous avons choisi est basé sur le principe d'une cellule à décharge corona.

Dans notre cahier des charges, nous avons imposé une capacité de production d'eau fortement concentrée en O_3 : 10 ppm nous permettant d'avoir une amplitude de travail importante. Ainsi, notre pilote est doté d'un générateur d'ozone d'une capacité de production maximale de 8 g / h (Figure 102). Ce pilote possède un système d'enrichissement en oxygène. En retirant l'azote de l'air, l'oxygène devient le gaz majoritaire. Le système de concentration de l'oxygène composé d'un compresseur d'air et de cartouches permettant l'appauvrissement de l'air ambiant en azote. L'air enrichi en oxygène (50 à 80 %) permet d'augmenter les rendements de l'appareil.

A la sortie du générateur, une vanne permet d'envoyer le flux d'ozone, soit pour une utilisation en ambiance, soit pour une utilisation dans l'eau.

En outre, notre pilote est équipé d'un système venturi permettant un meilleur rendement que le diffuseur. Afin d'augmenter les capacités de dissolution de l'ozone dans l'eau, nous avons ajouté un mélangeur statique en série à la sortie du venturi. Ce type d'élément permet de maintenir le régime turbulent créé dans le venturi. Ainsi, il permet d'optimiser les échanges gaz / eau. Enfin, une colonne

de contact de 30 L pour une hauteur de 1 m a également été ajoutée pour augmenter les temps d'échange.

Nous noterons la présence d'un pot de dégazage en haut de la colonne de contact. Il permet de séparer l'ozone résiduel gazeux qui ne s'est pas dissous. L'intérêt est d'avoir une eau ozonée plus sécurisante qui relargue moins d'ozone. L'eau est alors envoyée dans le bac de traitement. C'est une cuve en inox d'une contenance de 50 L possédant un couvercle et une évacuation dans le fond. C'est par cet orifice que l'eau est aspirée grâce à la pompe de recirculation. Notons que cette cuve possède une double paroi pour réguler la température du traitement.

Afin de contrôler et réguler la concentration en ozone dans l'eau. Un automate de régulation a été installé en parallèle du circuit d'eau primaire. La sonde de l'automate est une sonde ampérométrique. Les mesures sont réalisées avant le système venturi. Ainsi, la concentration en ozone dissous mesurée correspond à la concentration résiduelle d'ozone, c'est-à-dire celui qui n'a pas été consommé (réaction avec la matière organique et dégradation naturelle) en passant dans le bac de lavage. L'automate envoie ensuite les informations au générateur pour le contrôle de sa production.

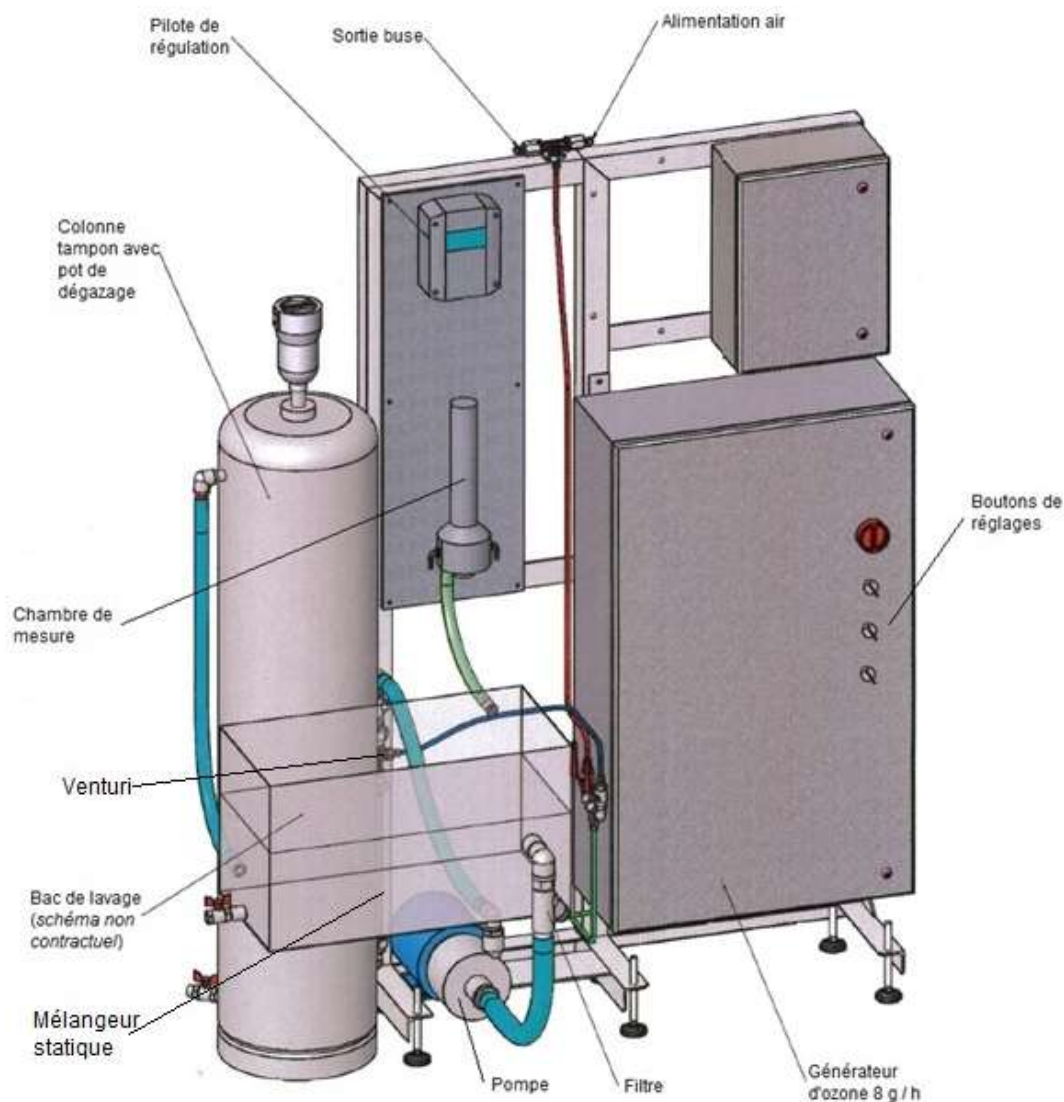


Figure 102 : schéma du pilote de génération d'ozone

7.2. Traitement de pommes ozonation

L'efficacité d'un traitement à l'ozone a été évaluée par l'utilisation d'un *Challenge Test* process, comme pour les essais d'assainissement à la vapeur. Ainsi, les pommes C artificiellement contaminées ont été préparées comme décrit précédemment.

Pour le traitement, les pommes sont immergées dans la cuve remplie d'eau ozonée. L'arrivée de l'eau y crée une turbulence qui pourrait « décrocher » les levures *Metschnikowia* par simple effet mécanique.

Nous avons réalisé un essai sans ozone pour déterminer le nombre de levures éliminées par la simple immersion où l'ozone est remplacé par de l'air enrichi en oxygène. Pour se faire, nous avons placé le système dans des conditions de traitements :

- pH de l'eau à TH 0 °f : 6,5 unité pH
- Température de l'eau : 12,5 °C
- Temps de traitement : 5 min
- Concentration en ozone : 0 ppm

Un échantillon de 5 pommes contaminées à $8,2 \cdot 10^5$ UFC / g d'épiderme $\pm 3,0 \cdot 10^5$ a été utilisé. Après traitement à l'eau, la concentration en levures sur l'épiderme des pommes étaient de $4,2 \cdot 10^5$ UFC / g d'épiderme $\pm 1,0 \cdot 10^5$. Ces résultats ont indiqué un abattement d'environ 50 % des levures *Metschnikowia* par lessivage. Nous devrions nous attendre à une augmentation de l'effet d'assainissement en présence d'ozone.

En raison du dysfonctionnement d'un élément du pilote de génération d'ozone, les essais n'ont pu continuer. L'expertise a été longue et le *timing* ne nous a pas permis de poursuivre l'étude.

V. Conclusion générale

Les conséquences d'une contamination microbienne excessive des produits végétaux, en particulier des fruits et légumes, représentent un frein à la valorisation à la fois du produit et de son coproduit. En effet, au cours de leur croissance, récolte, transport, autres transformations et manipulation, les pommes, par exemple, peuvent être contaminées par divers microorganismes provenant du sol, de l'air, de l'eau ou des déchets animaux. Afin de réduire le développement microbien, différentes pratiques de traitements phytosanitaires sont pratiquées, plusieurs fois pendant la production. Limiter l'utilisation de certains intrants, dans le but de préserver l'environnement et une alimentation sans ou avec de faibles teneurs en résidus, est une préoccupation de certains agriculteurs. La conséquence de cette limitation est le développement accru de microorganismes d'altérations ou pathogènes comme, les bactéries, les levures et les moisissures. Dans ce cas, l'application d'un traitement assainissant sévère est recommandée pour garantir la sécurité alimentaire mais limite le maintien des qualités organoleptiques et nutritionnelles du produit et minimise les chances de valorisation de ses coproduits.

Ainsi, la mise en place de (pré-)traitement avant ou pendant les process de transformation a été envisagée pour le contrôle et la maîtrise des charges microbiennes. Le choix de la technologie doit tenir compte des contraintes environnementales, de satisfaction du consommateur mais aussi avec la volonté de valorisation maximale de la matière première (coproduits : fibres, polyphénols...).

Le choix de la technologie dépendra de la matière première. Pour les pommes, le traitement thermique basse pression et une ozonation ont été retenus pour l'assainissement de l'épiderme. L'évaluation de l'efficacité des traitements nécessite une étude de l'écologie microbienne de la matière première en appliquant des méthodes de dénombrement et d'identification rapides.

Les travaux de thèse ont donc dans un premier temps portés sur l'étude de l'écologie microbienne de la pomme avant et pendant le stockage. Nous avons cherché à substituer la méthode classique de dénombrement par une autre plus rapide (Tempo®). Puis, des techniques de biologie moléculaire par PCRq, séquençage et PCR-DGGE ont été utilisées pour la quantification et l'identification des espèces. Elles nous ont apporté les connaissances nécessaires pour définir l'efficacité de traitements assainissant dans la réalisation de *challenge test* process. Enfin, nous avons eu l'opportunité de mettre en pratique ces différentes démarches scientifiques acquises pour le choix et la faisabilité de traitements de désinfections pour un coproduit végétal.

Au début de ces travaux, nous avons validé la substitution de la méthode classique de dénombrement sur gélose par la méthode rapide et semi-automatique Tempo®. Cette dernière, grâce à ces innovations basées sur la méthode des NPP, était adaptée à nos besoins car elle permet le traitement de gros volumes d'échantillons. Cette étude nous a permis de mettre en évidence l'importance de la matrice et de l'espèce microbienne sur les résultats de dénombrement. Les effets de matrice couplés à des flores microbiennes particulières peuvent biaiser les dénombrements entre les deux méthodes, comme nous l'avons vu avec les pommes issues de la culture raisonnée (R).

Cependant et en toute connaissance de cause, nous avons utilisé la méthode Tempo® pour le suivi des flores microbiennes au cours du temps.

La mise au point d'une méthode de dénombrement par PCR en temps réel nous a de nouveau alerté sur l'importance de la matrice pour les dénombrements. Lors du choix des amorces permettant l'amplification « universelle » des champignons, nous avons été confrontés à des problèmes de positivité de la matrice pomme. Sur les 4 couples d'amorces testés, un seul n'a pas réagi avec l'ADN de pommes. Il a fallu cependant faire des compromis sur l'étendu du spectre de ces amorces. Ainsi, seuls les 4 phylums majoritaires sont amplifiés. La conséquence est minime, car d'après nos résultats et selon la bibliographie, les espèces peuplant la surface du fruit se trouvent dans ces phylums. La poursuite de cette étude sur les flores naturelles est nécessaire car les difficultés techniques rencontrées nous ont empêché d'approfondir l'étude.

Les études quantitative et qualitative des flores microbiennes de pommes, avant et au cours du stockage, nous ont fourni les informations suivantes : chaque type de culture est caractérisé par une population microbienne qui lui propre ; les pommes Non Traitées sont les plus contaminées avec une flore fongique prépondérante, ce qui est logique puisque elles n'ont pas été traitée. Les analyses par séquençage d'ADN ont montré que *Metschnikowia sp.* représentait 83 % de la flore fongique. En revanche, les pommes Conventionnelles, ayant subi un traitement phytosanitaire drastique, présentent les taux de contamination les plus faible.

Les pommes Raisonnées possèdent des parts égales de *Metschnikowia sp.* et d'*A. strictum* (40 %). Pour les pommes Bio et Conventionnelles, les flores sont respectivement constituées de *C. carnescentis* (54 %) et *S. paraseus* (42 %). Toutes ces espèces sont couramment retrouvées sur l'épiderme des pommes mais aussi sur d'autres fruits comme la baie de raisin.

Après 8 mois de stockage au froid, une redistribution importante des espèces présentes a été observée. Pour les Bio, les effectifs de *C. carnescentis* sont descendus à 40 % alors que *Erythrobasidium hasegawianum* et *A. pullulans* passent à 22 et 11 % des effectifs totaux. Pour les Conventionnelles, l'effectif de *R. laryngis* passe à 53 %, faisant disparaître *S. paraseus*. Ces résultats obtenus nous confirment bien que les flores, en l'occurrence fongiques, varient en fonction de la période de stockage au froid. En effet, quelque soit le type de flore, nous avons constaté une diminution d'environ 90 % des effectifs totaux. Ces données sont très intéressantes car le froid jouerait un rôle biocide. Par ailleurs, il est également possible que les traitements de conservation, effectués au verger avant récolte, puissent agir lentement sur le long terme.

Les essais de désinfections à la vapeur en condition de challenge test ont permis d'appréhender l'effet biocide de la vapeur ainsi que son effet de lessivage. Cependant, nous avons vu que ceci n'était possible que pour certaines plages de température. A des basses températures aucun effet sur l'assainissement du fruit n'a été observé alors qu'à des températures élevées une altération irréversible de la pomme est remarquée avec des conséquences sur la qualité des composés antioxydants de l'épiderme. Des essais sur les flores naturelles restent cependant à réaliser. Pour le traitement assainissant à l'ozone, des écueils techniques ne nous ont pas permis de réaliser les essais nécessaires à l'évaluation de son efficacité. Ces incidents nous mettent en garde sur les difficultés que représentent la mise au point d'un pilote semi-industriel.

L'étude appliquée à des coproduits nous a permis de mettre en œuvre toute la démarche scientifique et technique de mise au point de traitement désinfectant. Nous avons constaté l'importance de la structure physique du produit qui influence l'efficacité du traitement. Dans notre cas, nous présumons que la présence d'anfractuosités de l'ordre de la dizaine de μm peut être responsable de l'échec des traitements rayonnant et gazeux. Elle serait également en partie responsable des vitesses lentes de montée en température à cœur des poudres. Les résultats obtenus nous permettent de mentionner l'importance de l'acquisition de certaines données tomographiques et physico-chimiques du produit pour un traitement efficace au même titre que l'identification et la quantification des microorganismes.

Pour la suite, il serait intéressant de poursuivre l'étude des flores microbiennes sur d'autres parcelles pour mieux appréhender l'impact des produits phytosanitaires et confirmer les tendances observées. L'utilisation de séquenceurs NGS (*Next Generation sequencing*), tel le pyroséquençage, nous permettrait d'augmenter le nombre de souches identifiées tout en réduisant considérablement le nombre d'étapes. La mise au point du traitement assainissant à l'ozone doit se poursuivre. Le couplage du traitement à la vapeur suivi d'une immersion dans de l'eau froide ozonée permettrait d'une part, de limiter le brunissement et les phénomènes de cuisson induits par la chaleur, et d'autre part, le choc thermique survenu permettrait l'augmentation de l'efficacité des deux procédés assainissants. Il sera également nécessaire de contrôler les qualités nutritionnelles des pommes pour quantifier l'impact de tels traitements sur les teneurs en vitamines, en polyphénols, en fibres et en sucres des épidermes.

Dans l'industrie de la pomme, 10 à 30 % du poids total de la matière première est écarté durant les process de transformation des jus et des compotes (épidermes, pépins). Ces coproduits sont une source importante de molécules antioxydantes. L'utilisation de matière première faiblement contaminée par des résidus de pesticides issus de la pétrochimie est donc recommandée. L'augmentation de la charge microbienne en résultat met l'accent sur l'importance de la mise au point d'un (pré-)traitement assainissant, avant stockage ou transformation. L'application d'un barème de traitement thermique, par exemple, moins sévère permettant ainsi de préserver les caractéristiques organoleptiques et nutritives du produit fini tout en assurant une meilleure valorisation de ces coproduits.

VI. Références bibliographiques

A

- Achen, M., Yousef, A.E., 2001. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157: H7 on apples. *J. FOOD Sci.-Chic.* 66, 1380–1384.
- Adachi, M., Sake, Y., Ishida, Y., 1996. Analysis of *Alexandrium* (dinophyceae) Species Using Sequences of the 5.8 s Ribosomal Dna and Internal Transcribed Spacer Regions1. *J. Phycol.* 32, 424–432.
- ADEME, 2015. Nos expertises, Produire autrement, Produits biosourcés [WWW Document]. ADEME. URL <http://www.ademe.fr/expertises/produire-autrement/produits-biosources> (accessed 8.28.15).
- Agence Bio, 2015. Les organismes certificateurs - Agence Française pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique - Agence BIO [WWW Document]. URL <http://www.agencebio.org/les-organismes-certificateurs> (accessed 9.11.15).
- AGRESTE, 2014. Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt - Agreste - La statistique, l'évaluation et la prospective agricole [WWW Document]. URL <http://agreste.agriculture.gouv.fr/> (accessed 8.11.15).
- Aka, J.-P., Courtois, F., Louarme, L., Nicolas, J., Billaud, C., 2013. Modelling the interactions between free phenols, L-ascorbic acid, apple polyphenoloxidase and oxygen during a thermal treatment. *Food Chem.* 138, 1289–1297.
- Alothman, M., Kaur, B., Fazilah, A., Bhat, R., Karim, A.A., 2010. Ozone-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 666–671.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Amiri, A., Bompeix, G., 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: consequences for decay development. *Plant Pathol.* 54, 74–81. doi:10.1111/j.1365-3059.2005.01112.x
- Anderson, I.C., Cairney, J.W.G., 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6, 769–779. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x
- Andrews, J.H., Kenerley, C.M., 1978. The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial populations of apple leaves. *Can. J. Microbiol.* 24, 1058–1072.
- Annamalai, J., Namasivayam, V., 2015. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ. Int.* 76, 78–97.
- ANPP, 2015. Consommation en France [WWW Document]. <http://www.lapomme.org/>. URL <http://www.lapomme.org/chiffres/consommation-en-france> (accessed 8.11.15).

B

- Baldi, I., Cordier, S., Coumoul, X., Elbaz, A., Gamet-Payraastre, L., Le Bailly, P., 2013. Pesticides effets sur la santé expertise collective synthèse et recommandations. *Inserm Inst. Natl. Santé Rech. Médicale* 22–34.
- Barkat, M., Kadri, F., 2012. Impact de deux modes de cuisson sur la teneur en polyphénols solubles de six légumes.
- Barsotti, L., Cheftel, J.C., 1999. Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Rev. Int.* 15, 181–213.
- Barth, M., Zhou, C.E.N., Mercier, J., Payne, F.A., 1995. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *J. Food Sci.* 60, 1286–1288.
- Bartlett, D.H., 2010. Introduction to High-Pressure Bioscience and Biotechnology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1189, 1–5.

- Bazarova, V.I., 1982. Use of ozone in storage of apples, in: Food Sci Technol Abstr. p. J1653.
- Beltrán, D., Selma, M.V., Marín, A., Gil, M.I., 2005. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5654–5663.
- Benbow, J.M., Sugar, D., 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Dis.* 83, 839–844.
- Bischof, J.C., Padanilam, J., Holmes, W.H., Ezzell, R.M., Lee, R.C., Tompkins, R.G., Yarmush, M.L., Toner, M., 1995. Dynamics of cell membrane permeability changes at supraphysiological temperatures. *Biophys. J.* 68, 2608–2614. doi:10.1016/S0006-3495(95)80445-5
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1999. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 8, 135–160.
- Blodgett, R., 2006. Most probable number from serial dilutions. *Bacteriol. Anal. Man.* 8th Ed Append. 2.
- Bompeix, G., 1968. Perméabilité lenticellaire des pommes et susceptibilité aux attaques fongiques. *Bull. Société Bot. Fr.* 115, 75–81.
- Borneman, J., Hartin, R.J., 2000. PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4356–4360. doi:10.1128/AEM.66.10.4356-4360.2000
- Botes, M., Kwaadsteniet, M. de, Cloete, T.E., 2013. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 91–108. doi:10.1007/s00216-012-6399-3
- Bourles, E., 2010. Aptitude variétale des pommes à la transformation. PhD thesis, Université d'Angers.
- Brat, P., Cuq, B., 2007. Transformation et conservation des fruits: Perte de la structure initiale. *Tech. Ing. Agroaliment.* F4.
- Broadwater, W.T., Hoehn, R.C., King, P.H., 1973. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl. Microbiol.* 26, 391–393.
- Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D., 2009. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 441–448.
- Bustin, S.A., 2005. Real-time reverse transcription PCR. *Encycl. Diagn. Genomics Proteomics* 1131–1135.
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A., Demazeau, G., 2008. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in kiwifruit and pineapple juices by high hydrostatic pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 275–278.

C

- Carasi, P., Racedo, S.M., Jacquot, C., Romanin, D.E., Serradell, M.A., Urdaci, M.C., 2015a. Impact of Kefir Derived *Lactobacillus kefir* on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota. *J. Immunol. Res.* 2015.
- Carasi, P., Racedo, S.M., Jacquot, C., Romanin, D.E., Serradell, M.A., Urdaci, M.C., 2015b. Impact of Kefir Derived *Lactobacillus kefir* on the Mucosal Immune Response and Gut Microbiota. *J. Immunol. Res.* 2015.
- Carvalho, M.L.C., Oliveira, M.S., Alterthum, F., 1991. An economical and time saving alternative to the most-probable-number method for the enumeration of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 14, 165–170. doi:10.1016/0167-7012(91)90019-M
- Castillo, A., McKenzie, K.S., Lucia, L.M., Acuff, G.R., 2003. Ozone treatment for reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* serotype Typhimurium on beef carcass surfaces. *J. Food Prot.* 66, 775–779.
- Caubet, R., Pendarros-Caubet, F., Ellison, W.J., 2008. The quantitative assessment of antimicrobial agents: Subinhibitory concentrations of *Eucalyptus globulus* essential oil against *Staphylococcus aureus*. *Pharm. Biol.* 46, 738–745.
- Chambre d'Agriculture, 2015. Chambres d'agriculture : Accueil [WWW Document]. URL <http://www.chambres-agriculture.fr/> (accessed 9.7.15).

- Chambre d'agriculture 47, 2015. Arboriculture - Chambre d'Agriculture de Lot-et-Garonne (47) [WWW Document]. URL <http://lot-et-garonne.chambagri.fr/productions-vegetales/arboriculture.html> (accessed 8.11.15).
- Chand-Goyal, T., Spotts, R.A., 1997. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol. Control* 10, 199–206.
- Chand-Goyal, T., Spotts, R.A., 1996. Enumeration of bacterial and yeast colonists of apple fruits and identification of epiphytic yeasts on pear fruits in the Pacific Northwest United States. *Microbiol. Res.* 151, 427–432.
- Cho, K.H., Pachepsky, Y.A., Kim, J.H., Guber, A.K., Shelton, D.R., Rowland, R., 2010. Release of *Escherichia coli* from the bottom sediment in a first-order creek: Experiment and reach-specific modeling. *J. Hydrol.* 391, 322–332.
- Clayton, R.A., Sutton, G., HINKLE, P.S., Bult, C., Fields, C., 1995. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 595–599.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.* 12, 407–411. doi:10.1016/S0958-6946(02)00023-7
- Cocolin, L., Bisson, L. f., Mills, D. a., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 81–87. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09210.x
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5113–5121.
- Codex Alimentarius, 2005. Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires COMMISSION DU CODEX ALIMENTARIUS.
- Colin-Henrion, M., 2008. De la pomme à la pomme transformée: impact du procédé sur deux composés d'intérêt nutritionnel Caractérisation physique et sensorielle des produits transformés. Université d'Angers.
- Connolly, P., Bloomfield, S.F., Denyer, S.P., 1994. The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetic products. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 68–74.
- Crouch, I., 2001. 1-Methylcyclopropene (Smartfresh TM) as an alternative to modified atmosphere and controlled atmosphere storage of apples and pears, in: VIII International Controlled Atmosphere Research Conference 600. pp. 433–436.
- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, A., Tóth-Markus, M., Lechner, N., 2006. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 7, 49–54.

D

- Dahllöf, I., Baillie, H., Kjelleberg, S., 2000. rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3376–3380. doi:10.1128/AEM.66.8.3376-3380.2000
- Davenport, R.R., 1976. Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. *Microbiol. Aer. Plant Surf.* 325–359.
- Davey, K.R., 1993. Extension of the generalized sterilization chart for combined temperature and pH. *LWT-Food Sci. Technol.* 26, 476–479.
- Décret n°53-578, 1953. Décret n°53-578 du 20 mai 1953 RELATIF A LA NOMENCLATURE DES ETABLISSEMENTS DANGEREUX, INSALUBRES OU INCOMMUNES., 53-578.
- De Curtis, F., Torriani, S., Rossi, F., De Cicco, V., 1996. Selection and use of *Metschnikowia pulcherrima* as a biological control agent for postharvest rots of peaches and table grapes. *Ann. Microbiol. Ed Enzimologia* 46, 45–55.

- Delbès, C., Ali-Mandjee, L., Montel, M.-C., 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and-independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1882–1891.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J., 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14, 273–285.
- Dezenclos, T., Ascon-Cabrera, M., Ascon, D., Lebeault, J.-M., Pauss, A., 1994. Optimisation of the indirect impedancemetry technique; a handy technique for microbial growth measurement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 232–238.
- Diao, H.F., Li, X.Y., Gu, J.D., Shi, H.C., Xie, Z.M., 2004. Electron microscopic investigation of the bactericidal action of electrochemical disinfection in comparison with chlorination, ozonation and Fenton reaction. *Process Biochem.* 39, 1421–1426.
- Diguta, C.F., Rousseaux, S., Weidmann, S., Bretin, N., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., 2010. Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. *FEMS Microbiol. Lett.* 313, 81–87.
- Dohan, J.M., Masschelein, W.J., 1987. The photochemical generation of ozone: Present state-of-the-art.
- Doores, S., Splittstoesser, D.F., 1983. The microbiology of apples and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 19, 133–149.
- Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, J.-F., 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.* 39, 2207–2218.
- Dosti, B., GUZEL-SEYDİM, Z., Greene, A.K., 2005. Effectiveness of ozone, heat and chlorine for destroying common food spoilage bacteria in synthetic media and biofilms†. *Int. J. Dairy Technol.* 58, 19–24.
- Drapé, M., 2013. EARL Garonne Valley, Sérignac-sur-Garonne (47).
- Dubois, M., Coste, C., Despres, A.-G., Efsthathiou, T., Nio, C., Dumont, E., Parent-Massin, D., 2006. Safety of Oxygreen®, an ozone treatment on wheat grains. Part 2. Is there a substantial equivalence between Oxygreen-treated wheat grains and untreated wheat grains? *Food Addit. Contam.* 23, 1–15.
- Dutton, C.M., Paynton, C., Sommer, S.S., 1993. General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucleic Acids Res.* 21, 2953.

E - F

- EMBL, 2015. EMBL European Bioinformatics Institute [WWW Document]. URL <http://www.ebi.ac.uk/> (accessed 8.24.15).
- Environmental Working Group, 2015. EWG [WWW Document]. EWG. URL <http://www.ewg.org/> (accessed 10.18.15).
- Erickson, M.C., Kornacki, J.L., 2003. *Bacillus anthracis*: Current Knowledge in Relation to Contamination of Food. *J. Food Prot.* 66, 691–699.
- Esnault, R., 2004. *Physiologie végétale* - Dunod [WWW Document]. URL <http://www.dunod.com/sciences-techniques/sciences-fondamentales/sciences-de-la-vie-et-sante/master-et-doctorat-capes-agreg/physiologie-vege-0> (accessed 8.11.15).
- Fallik, E., 1996. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit - FALLIK - 2003 - Plant Pathology - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-99.x/abstract> (accessed 8.17.15).
- Farkas, J., Doyle, M.P., Beuchat, L.R., 2007. Physical methods of food preservation. *Food Microbiol. Fundam. Front.* 685–712.
- Ferris, M.J., Muyzer, G., Ward, D.M., Muyzer, G., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities.

- Fine, F., Gervais, P., 2004. Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *J. Food Prot.* 67, 787–792.
- Fodde, R., Losekoot, M., 1994. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum. Mutat.* 3, 83–94.
- Forney, C.F., Song, J., Fan, L., Hildebrand, P.D., Jordan, M.A., 2003. Ozone and 1-methylcyclopropene alter the postharvest quality of broccoli. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128, 403–408.
- Franklin, M.W., 1914. Air Ozonation. *Ind. Eng. Chem.* 6, 850–855.
- Fruits & Légumes, 2014. Fruits & Légumes - Les fruits et légumes frais [WWW Document]. URL <http://www.lesfruitsetlegumesfrais.com/fruits-legumes/liste?x=6&y=52&sa=a&fp1=19&fp2=&rl=> (accessed 8.11.15).

G

- Gaillard, S., Leguérinel, I., Mafart, P., 1998. Model for combined effects of temperature, pH and water activity on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *J. FOOD Sci.-Chic.* 63, 887–889.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 1–28.
- Gayan, E., Alvarez, I., Condon, S., 2013. Inactivation of bacterial spores by UV-C light. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19, 140–145. doi:10.1016/j.ifset.2013.04.007
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F., 2005. GInaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 95–105.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A.C., Cacco, G., van Elsas, J.D., 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 38, 1–15.
- Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M., 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6, 995–1001.
- Gil, M.I., Selma, M.V., López-Gálvez, F., Allende, A., 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 37–45.
- Gomez-Lopez, V.M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., Debevere, J., 2005. Intense light pulses decontamination of minimally processed vegetables and their shelf-life. *Int. J. Food Microbiol.* 103, 79–89.
- Gomez-Lopez, V.M., Ragaert, P., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007. Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 464–473.
- Góngora-Nieto, M.M., Sepúlveda, D.R., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 2002. Food processing by pulsed electric fields: treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *LWT-Food Sci. Technol.* 35, 375–388.
- Goodridge, L.D., Willford, J., Kalchayanand, N., 2006. Destruction of *Salmonella* Enteritidis inoculated onto raw almonds by high hydrostatic pressure. *Food Res. Int.* 39, 408–412.
- Grahl, T., Märkl, H., 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 148–157.
- Granado, J., Thürig, B., Kieffer, E., Petrini, L., Fließbach, A., Tamm, L., Weibel, F.P., Wyss, G.S., 2008. Culturable fungi of stored “golden delicious” apple fruits: a one-season comparison study of organic and integrated production systems in Switzerland. *Microb. Ecol.* 56, 720–732.
- Griffiths, L.J., Anyim, M., Doffman, S.R., Wilks, M., Millar, M.R., Agrawal, S.G., 2006. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 55, 1187–1191.
- Grube, M., Schmid, F., Berg, G., 2011. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biol.* 115, 978–986.

- Guibert, Y., 2013. Verger de la goutte d'or, Damazan (47).
- Gutell, R.R., Larsen, N., Woese, C.R., 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10–26.
- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C., 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT-Food Sci. Technol.* 37, 453–460.

H

- Hansen, M.C., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Molin, S., 1998. Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 141–149.
- Harker, F.R., Kupferman, E.M., Marin, A.B., Gunson, F.A., Triggs, C.M., 2008. Eating quality standards for apples based on consumer preferences. *Postharvest Biol. Technol.* 50, 70–78. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.03.020
- Hayashi, K., 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* 34–8.
- Hedberg, C.W., 1996. Foodborne disease: How to respond? *Med. J. Aust.* 165, 667–667.
- Heim, C., Glas, K., 2011. Ozone I: characteristics/generation/possible applications. *Brew Sci* 64, 8–12.
- Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D., 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields—basic concepts for process design. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 103–111.
- Helbig, J., 2001. Field and laboratory investigations into the effectiveness of *Rhodotorula glutinis* (isolate 10391) against *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in strawberry. *Z. Für Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 108, 356–368.
- Herrera, M.L., M'Cann, J.I., Ferrero, C., Hagiwara, T., Zaritzky, N.E., Hartel, R.W., 2007. Thermal, mechanical, and molecular relaxation properties of frozen sucrose and fructose solutions containing hydrocolloids. *Food Biophys.* 2, 20–28. doi:10.1007/s11483-007-9025-8
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J., Zhang, N., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547. doi:10.1016/j.mycres.2007.03.004
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 411–453.
- Hiramoto, T., 1984. Method of sterilization. Google Patents.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7276–7280.
- Hong, H., Pruden, A., Reardon, K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J. Microbiol. Methods* 69, 52–64.

- Huang, E., Mittal, G.S., Griffiths, M.W., 2006. Inactivation of *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg using combination treatments of pulsed electric field, high pressure and ultrasound. *Biosyst. Eng.* 94, 403–413.
- Hui, Y.H., 2008. *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. John Wiley & Sons.
- Hu, Q., Viswanadham, S., Joshi, R.P., Schoenbach, K.H., Beebe, S.J., Blackmore, P.F., 2005. Simulations of transient membrane behavior in cells subjected to a high-intensity ultrashort electric pulse. *Phys. Rev. E* 71, 031914.
- Hurst, C.J., Crawford, R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A., 2007. *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology Press.

I - J

- Inan, F., Pala, M., Doymaz, I., 2007. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B 1 in red pepper. *J. Stored Prod. Res.* 43, 425–429.
- Inoue, D., Wada, K., Sei, K., Ike, M., Fujita, M., 2005. Comparative evaluation of quantitative polymerase chain reaction methods for routine enumeration of specific bacterial DNA in aquatic samples. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1029–1035.
- INRS, 2015. Santé et sécurité au travail - INRS [WWW Document]. URL <http://www.inrs.fr/> (accessed 9.7.15).
- INRS, 2004a. Référence INRS : ND 2098 - Valeurs limites d'exposition professionnelle aux agents chimiques en France.
- INRS, 2004b. Référence INRS : ND 2190-191-03 - Indices biologiques d'exposition.
- ISO 7218:2007/Amd 1:2013, A., 2013. ISO 7218:2007/Amd 1:2013 [WWW Document]. URL http://www.iso.org/iso/fr/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=52204 (accessed 8.28.15).
- Jasser, M.S. Al, 2010. Effect of storage temperatures on microbial load of some dates palm fruit sold in Saudi Arabia market. *Afr. J. Food Sci.* 4, 359–363.
- Johnson, D., 2002. Improvement in the storage quality of apples in the UK by the use of 1-MCP (SmartFresh™), in: *International Conference: Postharvest Unlimited* 599. pp. 39–47.
- Johnston, J.W., Hewett, E.W., Hertog, M.L.A.T.M., 2002. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: A review. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 30, 145–160. doi:10.1080/01140671.2002.9514210
- Jørgensen, F., Stephens, P. j., Knøchel, S., 1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 274–281. doi:10.1111/j.1365-2672.1995.tb03137.x
- Juneja, V.K., Novak, J.S., Sapers, G.M., 2002. *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. CRC Press.
- Justé, A., Thomma, B., Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* 25, 745–761.

K

- Karabulut, O.A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Wiess, B., Droby, S., 2004. Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Sci. Technol.* 14, 513–521.
- Karaca, H., 2010. Use of ozone in the citrus industry. *Ozone Sci. Eng.* 32, 122–129.
- Kaur, J., Ledward, D.A., Park, R.W.A., Robson, R.L., 1998. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157: H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 325–330.
- Kerstens, M., Boulet, G., Pintelon, I., Hellings, M., Voeten, L., Delputte, P., Maes, L., Cos, P., 2013. Quantification of *Candida albicans* by flow cytometry using TO-PRO®-3 iodide as a single-stain viability dye. *J. Microbiol. Methods* 92, 189–191. doi:10.1016/j.mimet.2012.12.006

- Khadre, M.A., Yousef, A.E., Kim, J.G., 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *J. FOOD Sci.-Chic.* 66, 1242–1253.
- Khan, M.M.T., Pyle, B.H., Camper, A.K., 2010. Specific and Rapid Enumeration of Viable but Nonculturable and Viable-Culturable Gram-Negative Bacteria by Using Flow Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5088–5096. doi:10.1128/AEM.02932-09
- Khot, P.D., Ko, D.L., Fredricks, D.N., 2009. Sequencing and Analysis of Fungal rRNA Operons for Development of Broad-Range Fungal PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1559–1565. doi:10.1128/AEM.02383-08
- Kim, J.-G., 1998. Ozone, as an antimicrobial agent in minimally processed foods. The Ohio State University.
- Kim, J.-G., Yousef, A.E., Khadre, M.A., 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. *Adv. Food Nutr. Res.* 45, 167–218.
- Kirchman, D., Sigda, J., Kapuscinski, R., Mitchell, R., 1982. Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 376–382.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Khironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Methods* 58, 169–188. doi:10.1016/j.mimet.2004.04.006
- Kolb, J.F., Kono, S., Schoenbach, K.H., 2006. Nanosecond pulsed electric field generators for the study of subcellular effects. *Bioelectromagnetics* 27, 172–187.
- Komanapalli, I.R., Lau, B.H.S., 1996. Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 610–614.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., Irudayaraj, J., 2004. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. *J. Food Prot.* 67, 1027–1030.
- Kuprianoff, J., 1953. The use of ozone for the cold storage of fruit. *Z. Kaltentech* 10, 1–4.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371. doi:10.1023/A:1001761008817

L

- Laroche, C., Fine, F., Gervais, P., 2005. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 307–315. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.023
- Lee, D.-H., Zo, Y.-G., Kim, S.-J., 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3112–3120.
- Levine, H., 2002. Introduction - Progress in amorphous food and pharmaceutical systems, in: Levine, H. (Ed.), *Amorphous Food and Pharmaceutical Systems*. Royal Soc Chemistry, Cambridge, pp. 1–8.
- Levy, C., 2010. Principaux facteurs influençant l'efficacité de la lumière pulsée pour la décontamination des microorganismes pathogènes et d'altération des denrées alimentaires (phdthesis). Université d'Avignon.
- Levy, C., Bornard, I., Carlin, F., 2011. Deposition of *Bacillus subtilis* spores using an airbrush-spray or spots to study surface decontamination by pulsed light. *J. Microbiol. Methods* 84, 223–227. doi:10.1016/j.mimet.2010.11.021
- Ley, R.E., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2006. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. *Cell* 124, 837–848. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017
- Liu, C.M., Kachur, S., Dwan, M.G., Abraham, A.G., Aziz, M., Hsueh, P.-R., Huang, Y.-T., Busch, J.D., Lamit, L.J., Gehring, C.A., Keim, P., Price, L.B., 2012. FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.* 12. doi:10.1186/1471-2180-12-255
- Liu, P., Duan, W., Wang, Q., Li, X., 2010. The damage of outer membrane of *Escherichia coli* in the presence of TiO₂ combined with UV light. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 78, 171–176.

- LI, X., ZHANG, H., WU, M., ZHANG, Y., ZHANG, C., 2008. Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. *J. Environ. Sci.* 20, 619–625. doi:10.1016/S1001-0742(08)62103-8
- Lund, B., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W., 2000. *Microbiological Safety and Quality of Food*. Springer Science & Business Media.
- Lurie, S., 1998. Postharvest heat treatments. *Postharvest Biol. Technol.* 14, 257–269. doi:10.1016/S0925-5214(98)00045-3

M

- Macherey-Nagel, 2015. DNA extraction kit - NucleoSpin Soil [WWW Document]. URL <http://www.mn-net.com/tabid/11352/default.aspx> (accessed 9.1.15).
- Mafard, P., 1997. *Génie industriel alimentaire. Tome 1 : Procédés physiques de conservation* (2^e Éd.) MAFART Pierre [WWW Document]. Libr. Lavoisier. URL <http://www.lavoisier.fr/livre/agro-alimentaire/genie-industriel-alimentaire-tome-1-procedes-physiques-de-conservation-2-ed/mafart/descriptif-9782743002114> (accessed 9.2.15).
- Mahfoud, R., Maresca, M., Garmy, N., Fantini, J., 2002. The Mycotoxin Patulin Alters the Barrier Function of the Intestinal Epithelium: Mechanism of Action of the Toxin and Protective Effects of Glutathione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 181, 209–218. doi:10.1006/taap.2002.9417
- Manousaridis, G., Nerantzaki, A., Paleologos, E.K., Tsiotsias, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G., 2005. Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiol.* 22, 1–9.
- Marques Martins, G., 2012. *Communautés microbiennes de la baie de raisin: Incidence des facteurs biotiques et abiotiques*. Bordeaux 2.
- Masia, A., 1998. Superoxide dismutase and catalase activities in apple fruit during ripening and post-harvest and with special reference to ethylene. *Physiol. Plant.* 104, 668–672.
- Massias, A., 2015. *Valorisation fonctionnelle et antioxydante des épidermes de pommes Golden Delicious*.
- Massias, B., 2008. Development of Molecular Tools for the Identification of Complex Bacterial Flora- Application to the Study of Galliform Gut Flora. INAPG (AgroParisTech).
- Maxin, P., 2012. Improving apple quality by hot water treatment PhD Thesis Peter Maxin 16_04_12.pdf [WWW Document]. URL http://pure.au.dk/portal/files/47656934/Improving_apple_quality_by_hot_water_treatment_PhD_Thesis_Peter_Maxin_16_04_12.pdf (accessed 8.17.15).
- Maxin, P., Weber, R.W.S., Pedersen, H.L., Williams, M., 2012a. Control of a wide range of storage rots in naturally infected apples by hot-water dipping and rinsing. *Postharvest Biol. Technol.* 70, 25–31. doi:10.1016/j.postharvbio.2012.04.001
- Maxin, P., Weber, R.W.S., Petersen, H.L., Williams, M., 2012b. Hot-Water Dipping of Apples to Control *Penicillium expansum*, *Neonectria galligena* and *Botrytis cinerea*: Effects of Temperature on Spore Germination and Fruit Rots on JSTOR [WWW Document]. URL <http://www.jstor.org/stable/24126518> (accessed 8.17.15).
- Mazzola, M., Manici, L.M., 2012. Apple replant disease: role of microbial ecology in cause and control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 45–65.
- McKinlay, R., Plant, J.A., Bell, J.N.B., Voulvoulis, N., 2008. Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environ. Int.* 34, 168–183.
- Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N., Kurtzman, C.P., 1993. Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 368–373.
- Metzker, M.L., 2010. Sequencing technologies — the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11, 31–46. doi:10.1038/nrg2626
- Meyer, R.S., Cooper, K.L., Knorr, D., Lelieveld, H.L., 2000. High-pressure sterilization of foods. *Food Technol.* 54, 67–72.

- Mezule, L., Los, A., 2015. Automated detection and enumeration of fluorescently labelled bacteria with flow cytometry. *Environ. Technol. Resour. Proc. Int. Sci. Pract. Conf.* 2, 202. doi:10.17770/etr2015vol2.284
- Mittendorfer, J., Bierbaumer, H.P., Gratzl, F., Kellauer, E., 2002. Decontamination of food packaging using electron beam—status and prospects. *Radiat. Phys. Chem.* 63, 833–836.
- Mnif, W., Hassine, A.I.H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B., 2011. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 8, 2265–2303.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., Muyzer, G., Winter, C., Herndl, G.J., 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518–3525.
- Möhlenhoff, P., Müller, L., Gorbushina, A.A., Petersen, K., 2001. Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 169–173. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10516.x
- Moras, P., Chapon, J.-F., 1983. Entreposage et conservation des fruits et légumes frais: guide pratique de l'utilisation du froid. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes.
- Multon, J.-L., 1994. La qualité des produits alimentaires: politique, incitations, gestion et contrôle. Technique et Documentation Lavoisier.
- Murray, R.G.E., Steed, P., Elson, H.E., 1965. The location of the mucopeptide in sections of the cell wall of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Can. J. Microbiol.* 11, 547–560.
- Murrell, W.G., Scott, W.J., 1966. The Heat Resistance of Bacterial Spores at Various Water Activities. *J. Gen. Microbiol.* 43, 411–425. doi:10.1099/00221287-43-3-411
- Muyzer, G., 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317–322.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Muyzer, G., Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 127–141.

N

- Nadas, A., Olmo, M., Garcia, J.M., 2003. Growth of *Botrytis cinerea* and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres. *J. Food Sci.* 68, 1798–1802.
- Naito, S., Takahara, H., 2006. Ozone contribution in food industry in Japan. *Ozone Sci. Eng.* 28, 425–429.
- Najafi, M.B.H., Khodaparast, M.H., 2009. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control* 20, 27–30.
- NCBI, 2015a. Genome List [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/> (accessed 8.21.15).
- NCBI, 2015b. GenBank Home [WWW Document]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 8.24.15).
- Neeley, E.T., Phister, T.G., Mills, D.A., 2005. Differential real-time PCR assay for enumeration of lactic acid bacteria in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8954–8957.
- Neilson, J.W., Jordan, F.L., Maier, R.M., 2013. Analysis of Artifacts Suggests DGGE Should Not Be Used For Quantitative Diversity Analysis. *J. Microbiol. Methods* 92, 256–263. doi:10.1016/j.mimet.2012.12.021
- Nguyen-the, C., Carlin, F., 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 371–401. doi:10.1080/10408399409527668

- Nichols, D., 2007. Cultivation gives context to the microbial ecologist: Comments on cultivation-dependent and -independent ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 351–357. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00332.x
- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572.
- Nisiotou, A.A., Rantsiou, K., Iliopoulos, V., Cocolin, L., Nychas, G.-J.E., 2011. Bacterial species associated with sound and *Botrytis*-infected grapes from a Greek vineyard. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 432–436.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178, 5636–5643.

O - P - Q

- O'Donnell, C., Tiwari, B.K., Cullen, P.J., Rice, R.G., 2012. *Ozone in food processing*. John Wiley & Sons.
- Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A., 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691–3701.
- Okafor, N., 2011. *Environmental microbiology of aquatic and waste systems*. Springer Science & Business Media.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 2766–2770.
- Pascual, A., Llorca, I., Canut, A., 2007. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends Food Sci. Technol.* 18, S29–S35.
- Paull, R., 1999. Effect of temperature and relative humidity on fresh commodity quality. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 263–277.
- Pérez, A.G., Sanz, C., Ríos, J.J., Olías, R., Olías, J.M., 1999. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1652–1656.
- Perrier-Cornet, J.-M., Hayert, M., Gervais, P., 1999. Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *J. Appl. Microbiol.* 87, 1–7.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45–e45.
- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., Gullino, M.L., 1997. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 11, 131–140.
- Pinto, P.M., Resende, M.A., Koga-Ito, C.Y., Ferreira, J.A., Tandler, M., 2004. rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Can. J. Microbiol.* 50, 514–520.
- Pitt, J.I., 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. *Water Relat. Foods* 273–307.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H., Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4, 865–877.
- Prieur, D., Geslin, C., Payan, C., 2011. *Mini Manuel de Microbiologie : Cours et QCM/QROC - ScholarVox Université de Bordeaux* [WWW Document]. URL <http://u-bordeaux.scholarvox.com.docelec.u-bordeaux.fr/book/88805354> (accessed 9.2.15).
- PROGNOSFRUIT, 2014. *Production en France par variétés* [WWW Document]. La Pomme. URL <http://www.lapomme.org/chiffres/production-en-france-par-varietes> (accessed 8.11.15).
- Qin, B.-L., Pothakamury, U.R., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., Peleg, M., 1996. Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 603–627.

R

- RDP, 2015. Ribosomal Database Project Release 11 -- Sequence Analysis Tools [WWW Document]. URL <https://rdp.cme.msu.edu/> (accessed 8.24.15).
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., Palnikar, P., 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3471–3475.
- Ritz, K., 2007. The Plate Debate: Cultivable communities have no utility in contemporary environmental microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 358–362. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00331.x
- Rodgers, S.L., Cash, J.N., Siddiq, M., Ryser, E.T., 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *J. Food Prot.* 67, 721–731.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N., Brunet, R., 2009. L'analyse de l'eau-9ème édition-Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Dunod.
- Roszak, D.B., Colwell, R.R., MICROBIOLOGY, M.U.C.P.D.O., 1987. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. Defense Technical Information Center.
- Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Fouracre, R.A., McIlvaney, L., Farish, O., 1999. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1312–1315.
- Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S.E., Nissen, H., 2004. Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5010–5018.

S

- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157, 267–274.
- Saitoh, S., Iwasaki, K., Yagi, O., 2002. Development of a New Most-probable-number Method for Enumerating Methanotrophs, Using 48-well Microtiter Plates. *Microbes Environ.* 17, 191–196.
- Sale, A.J.H., Hamilton, W.A., 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* 148, 781–788.
- Salles, J.F., De Souza, F.A., van Elsas, J.D., 2002. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1595–1603.
- Samelis, J., Bleicher, A., Delbès-Paus, C., Kakouri, A., Neuhaus, K., Montel, M.-C., 2011. FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiol.* 28, 76–83.
- Sánchez, J.I., Rossetti, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Giraffa, G., 2006. Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *J. Microbiol. Methods* 65, 268–277.
- Sandhu, G.S., Kline, B.C., Stockman, L., Roberts, G.D., 1995. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2913–2919.
- Schirra, M., hallewin, G. D', Ben-Yehoshua, S., Fallik, E., 2000. Host–pathogen interactions modulated by heat treatment. *Postharvest Biol. Technol.* 21, 71–85. doi:10.1016/S0925-5214(00)00166-6

- Schmid, F., Moser, G., Mueller, H., Berg, G., 2011. Functional and Structural Microbial Diversity in Organic and Conventional Viticulture: Organic Farming Benefits Natural Biocontrol Agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2188–2191. doi:10.1128/AEM.02187-10
- Schomer, H.A., McColloch, L.P., 1948. Ozone in relation to storage of apples.
- Scott, J.H., Schekman, R., 1980. Lyticase: Endoglucanase and Protease Activities That Act Together in Yeast Cell Lysis. *J. Bacteriol.* 142, 414–423.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., Uchiyama, H., 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnol. Lett.* 23, 1205–1208.
- Seo, E.-Y., Ahn, T.-S., Zo, Y.-G., 2010. Agreement, Precision, and Accuracy of Epifluorescence Microscopy Methods for Enumeration of Total Bacterial Numbers. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1981–1991. doi:10.1128/AEM.01724-09
- Setlow, P., 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–525. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M., 1989. Attachment of a 40-base-pair G+ C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 232–236.
- El Sheikha, A.F. El, Condur, A., Métayer, I., Le Nguyen, D.D., Loiseau, G., Montet, D., 2009. Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR–DGGE: preliminary application to *Physalis* fruits from Egypt. *Yeast* 26, 567–573. doi:10.1002/yea.1707
- El Sheikha, A.F. El, Durand, N., Sarter, S., Okullo, J.B.L., Montet, D., 2012. Study of the microbial discrimination of fruits by PCR–DGGE: Application to the determination of the geographical origin of *Physalis* fruits from Colombia, Egypt, Uganda and Madagascar. *Food Control* 24, 57–63. doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.003
- Singh, D.K., 2012. Pesticide chemistry and toxicology. Bentham eBooks.
- Sipiczki, M., Pfliegler, W.P., Holb, I.J., 2013. *Metschnikowia* Species Share a Pool of Diverse rRNA Genes Differing in Regions That Determine Hairpin-Loop Structures and Evolve by Reticulation. *PLoS ONE* 8, e67384. doi:10.1371/journal.pone.0067384
- Skog, and C.C., 2001. Effect of ozone on qualities of fruits and vegetables in cold storage. *Can. J. Plant Sci.* 81, 773–778.
- Smock, R.M., Watson, R.D., 1941. Ozone in apple storage. *Refrig Eng United States* 42.
- SNV Jussieu, 2012. Pomme [WWW Document]. URL <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Fruits/pomme.htm> (accessed 8.11.15).
- Song, L., Wu, J., Xi, C., 2012. Biofilms on environmental surfaces: Evaluation of the disinfection efficacy of a novel steam vapor system. *Am. J. Infect. Control* 40, 926–930. doi:10.1016/j.ajic.2011.11.013
- Sorokulova, I. b., Reva, O. n., Smirnov, V. v., Pinchuk, I. v., Lapa, S. v., Urdaci, M. c., 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rye bread. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 169–173. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01372.x
- Spiegelman, D., Whissell, G., Greer, C.W., 2005. A survey of the methods for the characterization of microbial consortia and communities. *Can. J. Microbiol.* 51, 355–386.
- Spotts, R.A., Cervantes, L.A., 1992. Effect of ozonated water on postharvest pathogens of pear in laboratory and packinghouse tests. *Plant Dis.* 76, 256–259.
- Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321–346. doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.001541
- Sugiyama, H., 1951. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.* 62, 81.

- Sutton, S., 2010. The Most Probable Number Method and Its Uses in Enumeration, Qualification, and Validation [WWW Document]. URL <http://www.ivtnetwork.com/article/most-probable-number-method-and-its-uses-enumeration-qualification-and-validation> (accessed 8.19.15).
- Sym'Previus, 2015. Sym'Previus - Predictive Microbiology - Access software [WWW Document]. URL http://www.symprevius.net/index.php?rub=access_software (accessed 9.2.15).

T

- Tachikawa, M., Yamanaka, K., Nakamuro, K., 2009. Studies on the disinfection and removal of biofilms by ozone water using an artificial microbial biofilm system. *Ozone Sci. Eng.* 31, 3–9.
- Takakura, N., Sanders, P., Fessard, V., Le Hégarat, L., 2013. In vitro combined cytotoxic effects of pesticide cocktails simultaneously found in the French diet. *Food Chem. Toxicol.* 52, 153–162.
- Tanner, B.D., 2009. Reduction in infection risk through treatment of microbially contaminated surfaces with a novel, portable, saturated steam vapor disinfection system. *Am. J. Infect. Control* 37, 20–27. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.008
- Taylor, M.W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H.A., Goddard, M.R., 2014. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ. Microbiol.* n/a–n/a. doi:10.1111/1462-2920.12456
- Teixido, N., Usall, J., Magan, N., Vinas, I., 1999. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. *Ann. Appl. Biol.* 134, 109–116.
- Torlak, E., Akan, I.M., Gökmen, M., 2008. Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 566–570.
- Torres, B., Tiwari, B.K., Patras, A., Wijngaard, H.H., Brunton, N., Cullen, P.J., O'Donnell, C.P., 2011. Effect of ozone processing on the colour, rheological properties and phenolic content of apple juice. *Food Chem.* 124, 721–726.
- Torsvik, V., Øvreås, L., 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240–245. doi:10.1016/S1369-5274(02)00324-7

V - W

- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Fontana, P., Bhatnagar, S.K., Troggio, M., Pruss, D., Salvi, S., Pindo, M., Baldi, P., Castelletti, S., Cavaiuolo, M., Coppola, G., Costa, F., Cova, V., Dal Ri, A., Goremykin, V., Komjanc, M., Longhi, S., Magnago, P., Malacarne, G., Malnoid, M., Micheletti, D., Moretto, M., Perazzolli, M., Si-Ammour, A., Vezzulli, S., Zini, E., Eldredge, G., Fitzgerald, L.M., Gutin, N., Lanchbury, J., Macalma, T., Mitchell, J.T., Reid, J., Wardell, B., Kodira, C., Chen, Z., Desany, B., Niazi, F., Palmer, M., Koepke, T., Jiwan, D., Schaeffer, S., Krishnan, V., Wu, C., Chu, V.T., King, S.T., Vick, J., Tao, Q., Mraz, A., Stormo, A., Stormo, K., Bogden, R., Ederle, D., Stella, A., Vecchiotti, A., Kater, M.M., Masiero, S., Lasserre, P., Lespinasse, Y., Allan, A.C., Bus, V., Chagné, D., Crowhurst, R.N., Gleave, A.P., Lavezzo, E., Fawcett, J.A., Proost, S., Rouzé, P., Sterck, L., Toppo, S., Lazzari, B., Hellens, R.P., Durel, C.-E., Gutin, A., Bumgarner, R.E., Gardiner, S.E., Skolnick, M., Egholm, M., Van de Peer, Y., Salamini, F., Viola, R., 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat. Genet.* 42, 833–839. doi:10.1038/ng.654
- Ventosa, A., la Haba, R.R. de, Sánchez-Porro, C., Papke, R.T., 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Curr. Opin. Microbiol., Environmental microbiology • Extremophiles* 25, 80–87. doi:10.1016/j.mib.2015.05.002

- Voronov, A., 2008. New generation of low pressure mercury lamps for producing ozone. *Ozone Sci. Eng.* 30, 395–397.
- Wagner, A., Blackstone, N., Cartwright, P., Dick, M., Misof, B., Snow, P., Wagner, G.P., Bartels, J., Murtha, M., Pendleton, J., 1994. Surveys of gene families using polymerase chain reaction: PCR selection and PCR drift. *Syst. Biol.* 250–261.
- Walls, I., Chuyate, R., 2000. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris* : *Alicyclobacillus* in the food industry, in: *Food Australia*. Presented at the World Congress of Food Science and Technology, Australian Institute of Food Science and Technology, pp. 286–288.
- Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K., Alatossava, T., 2000. Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 297–303. doi:10.1128/AEM.66.1.297-303.2000
- Wekhof, A., 2000. Disinfection with flash lamps. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 54, 264–276.
- Wekhof, A., Trompeter, F.-J., Franken, O., 2001. Pulsed UV disintegration (PUVD): a new sterilisation mechanism for packaging and broad medical-hospital applications, in: *The First International Conference on Ultraviolet Technologies*. pp. 14–16.
- Wilkes, J.G., Tucker, R.K., Montgomery, J.A., Cooper, W.M., Sutherland, J.B., Buzatu, D.A., 2012. Reduction of food matrix interference by a combination of sample preparation and multi-dimensional gating techniques to facilitate rapid, high sensitivity analysis for *Escherichia coli* serotype O157 by flow cytometry. *Food Microbiol.* 30, 281–288. doi:10.1016/j.fm.2011.11.002
- Wimalaratne, S.K., Farid, M.M., 2008. Pressure assisted thermal sterilization. *Food Bioprod. Process.* 86, 312–316.
- Wood, J. p., Lemieux, P., Betancourt, D., Kariher, P., Gatchalian, N. g., 2010. Dry thermal resistance of *Bacillus anthracis* (Sterne) spores and spores of other *Bacillus* species: implications for biological agent destruction via waste incineration. *J. Appl. Microbiol.* 109, 99–106. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04632.x
- Woody, S.T., Spear, R.N., Nordheim, E.V., Ives, A.R., Andrews, J.H., 2003. Single-leaf resolution of the temporal population dynamics of *Aureobasidium pullulans* on apple leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4892–4900.
- Wu, J.G., Luan, T.G., Lan, C.Y., Lo, W.H., Chan, G.Y.S., 2007. Efficacy evaluation of low-concentration of ozonated water in removal of residual diazinon, parathion, methyl-parathion and cypermethrin on vegetable. *J. Food Eng.* 79, 803–809.
- Wu, J., Lan, C., Chan, G.Y.S., 2009. Organophosphorus pesticide ozonation and formation of oxon intermediates. *Chemosphere* 76, 1308–1314.
- Wu, J., Luan, T., Lan, C., Lo, T.W.H., Chan, G.Y.S., 2007. Removal of residual pesticides on vegetable using ozonated water. *Food Control* 18, 466–472.
- Wu, Y., Mittal, G.S., Griffiths, M.W., 2005. Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials. *Biosyst. Eng.* 90, 1–7.
- Wuytack, E.Y., Phuong, L., Aertsen, A., Reyns, K.M.F., Marquenie, D., De Ketelaere, B., Masschalck, B., Van Opstal, I., Diels, A.M.J., Michiels, C.W., 2003. Comparison of sublethal injury induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by heat and by different nonthermal treatments. *J. Food Prot.* 66, 31–37.

Y - Z

- Yang, S.F., Hoffman, N.E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 155–189.
- Zhang, Q., QIN, B.-L., BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., Swanson, B.G., 1995. Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *J. Food Process. Preserv.* 19, 103–118.

- Zhang, Y.Q., Wu, Q.P., Zhang, J.M., Yang, X.H., 2011. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1006–1015.
- Zhao, M., Moy, J., Paull, R.E., 1996. Effect of gamma-irradiation on ripening papaya pectin. *Postharvest Biol. Technol.* 8, 209–222.
- Zitz, U., Domig, K.J., Hoehl, A., Weiss, H., Wilrich, P.-T., Kneifel, W., 2011. Evaluation of three applications of a semi-automated most-probable-number method for the assessment of microbiological parameters in dairy products. *Accreditation Qual. Assur.* 16, 299–309.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D., De Vos, W.M., 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3854–3859.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiol.* 27, 559–567.

VII. Annexes

Annexe I

Tableau XLV : table des intervalles de confiance pour le dénombrement des petits nombres

Nombre de colonies ¹⁾	Nombre de microorganismes	Limite de confiance au niveau 95 %		Pourcentage d'erreur pour la limite ²⁾	
		inférieure	supérieure	inférieure	supérieure
1	1	< 1	3	- 97	+ 457
2	1	< 1	4	- 88	+ 261
3	2	< 1	4	- 79	+ 192
4	2	1	5	- 73	+ 156
5	2	1	6	- 68	+ 133
6	3	1	6	- 63	+ 118
7	4	2	7	- 60	+ 106
8	4	2	8	- 57	+ 97
9	4	2	9	- 54	+ 90
10	5	2	9	- 52	+ 84
11	6	3	10	- 50	+ 79
12	6	3	10	- 48	+ 75
13	6	3	11	- 47	+ 71
14	7	4	12	- 45	+ 68
15	8	4	12	- 44	+ 65
16	8	5	13	- 43	+ 62
17	8	5	14	- 42	+ 60
18	9	5	14	- 41	+ 58
19	10	6	15	- 40	+ 56
20	10	6	15	- 39	+ 54
21	10	6	16	- 38	+ 53
22	11	7	17	- 37	+ 51
23	12	7	17	- 36	+ 50
24	12	8	18	- 36	+ 49
25	12	8	18	- 35	+ 48
26	13	8	19	- 35	+ 47
27	14	9	20	- 34	+ 46
28	14	9	20	- 34	+ 45
29	14	9	21	- 33	+ 44
30	15	10	21	- 32	+ 43

1) Comptées sur deux boîtes de Petri.

2) Par rapport au nombre de microorganismes (2^{ème} colonne).

Tableau XLVI : table de Macgrady à 3 entrées avec 3 tubes par série

Tables NPP (d'après la norme ISO 7218 :1996(F))

Tableau 1 - Table NPP pour 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) et 3 x 0,01 g (ml).

Nombre de résultats positifs			NPP	Catégorie lorsque le nombre d'essais de mesures est de 1 pour le lot considéré	Limites de confiance			
					>95%	>95%	>99%	>99%
0	0	0	<0,30		0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	0,4	3,6	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2	0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	3	36	2	44
3	1	3	16	0	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	3	40	2	56
3	2	3	29	3	9	99	5	152
3	3	0	24	1	44	99	3	152
3	3	1	46	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	20	400	10	570
3	3	3	>110					
autres valeurs			non cité dans la table ISO 7218 : 1996 (F)					

Tableau XLVII : échantillon de la table de Macgrady à 3 entrées pour 16 puits utilisée par le système TEMPO®

TEMPO® card (initial dilution ¼), the MPNs and 95 percent confidence intervals,									
Positive tubes	MPN/g	Confidence limits		proba	Positive tubes	MPN/g	Confidence limits		proba
0.1 0.01 0.001		Low	High		0.1 0.01 0.001		Low	High	
0 0 0	<1.0	--	--	--					
0 0 1	1	0.14	7.1	3.32E-03	12 9 1	43	27	69	2.04E-05
0 0 2	2	0.5	8	2.06E-05	12 9 2	46	29	72	3.87E-06
0 0 3	3	0.97	9.3	1.35E-07	12 9 3	48	31	76	4.83E-07
0 1 0	1	0.14	7.1	3.32E-02	12 9 4	51	33	80	4.43E-08
0 1 1	2	0.5	8	4.42E-04	12 10 0	43	27	69	9.98E-06
0 1 2	3	0.97	9.3	4.65E-06	12 10 1	46	29	73	4.06E-06
0 1 3	4	1.5	11	4.29E-08	12 10 2	49	31	77	8.21E-07
0 2 0	2	0.5	8.1	2.08E-03	12 10 3	51	33	80	1.09E-07
0 2 1	3	0.97	9.4	4.69E-05	12 11 0	46	29	73	1.56E-06
0 2 2	4	1.5	11	6.96E-07	12 11 1	49	31	77	6.77E-07
0 3 0	3	0.98	9.4	1.38E-04	12 11 2	52	33	81	1.46E-07
0 3 1	4	1.5	11	4.37E-06	12 12 0	49	31	78	2.00E-07

TEMPO® card (initial dilution ¼), the MPNs and 95 percent confidence intervals,									
Positive tubes		MPN/g	Confidence limits		proba	Positive tubes		MPN/g	proba
0.1	0.01 0.001		Low	High		0.1	0.01 0.001		
0 3 2		5.1	2.1	12	8.38E-08	12 12 1		52	9.26E-08
0 4 0		4	1.5	11	8.98E-06	13 0 0		23	1.84E-02
0 4 1		5.1	2.1	12	3.68E-07	13 0 1		26	4.08E-03
0 5 0		5.1	2.1	12	5.59E-07	13 0 2		28	4.61E-04
0 5 1		6.1	2.7	14	2.81E-08	13 0 3		30	3.51E-05

Annexe II

Tableau XLVIII : liste des traitements phytosanitaires du verger biologique

date	cible	produit	dosage/ha	matière active	qté m active/ha
23/03/13	tavelure	BN	12	soufre	2,76
26/03/13	tavelure	BN	12	soufre	2,76
27/03/13	lanigère	soufre	7	soufre	5,95
		ovipron	10	huile	
29/03/13	tavelure	BN	12	soufre	2,76
31/03/13	tavelure	BN	15	soufre	3,45
02/04/13	tavelure	BN	15	soufre	3,45
03/04/13	tavelure	BB	0,8	cuivre	0,16
		soufre	4	soufre	3,4
		solubor	1,5	bore	0
		sulfate de Zn	0,25	zinc	0
07/04/13	tavelure	BB	1	cuivre	0,2
		solubor	6	soufre	5,1
		ovipron	10	huile	0
12/04/13	tavelure	BN	13	soufre	2,99
		cuivrol	0,6	cuivre	0,108
		oxychlorure	0,2	cuivre	0,07
21/04/13	lanigère	soufre	7	soufre	5,95
		ovipron	10	huile	0
26/04/13	tavelure black root	cuivrol	0,9	cuivre	0,162
		oxychlorure	0,07	cuivre	0,0245
		soufre	3	soufre	2,55
30/04/13	tavelure	BN	15	soufre	3,45
02/05/13	tavelure	cuivrol	1	cuivre	0,18
		soufre	3	soufre	2,55
		solubor	0,8	bore	0
		vinasse betterave	3	K	0
02/05/13	pucerons	argile	50	argile	0
		ovipron	10	huile	0
07/05/13	tavelure black root	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		soufre	4	soufre	3,4
		solithe	2	calcium	0
		vinasse betterave	3	k	0
10/05/13	tavelure	BN	10	soufre	2,3
14/05/13	tavelure	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		soufre	4	soufre	3,4
		solithe	4	calcium	0
		vinasse betterave	2	k	0
17/05/13	tavelure	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		soufre	4	soufre	3,4
		solithe	2	calcium	0
		vinasse betterave	2	k	0
26/05/13	tavelure suie	cuivrol	0,7	cuivre	0,126
		soufre	4	soufre	3,4
		solithe	4	calcium	0
		sulfate de MG	5	mg	0

02/06/13	tavelure	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		soufre	4	soufre	3,4
		solithe	4	calcium	0
06/06/13	tavelure suie	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		soufre	3	soufre	2,55
		solithe	4	calcium	0
09/06/13	tavelure	BN	12	soufre	2,76
11/06/13	tavelure	armicarb	4	bicarbonate de k	0
		soufre	3	soufre	2,55
13/06/13	carpocapse	madex	1	virus granulose	0
17/06/13	tavelure suie	cuivrol	0,7	cuivre	0,126
		soufre	2	soufre	1,7
		solithe	4	calcium	0
19/06/13	tavelure	armicarb	4	bicarbonate de k	0
		soufre	3	soufre	2,55
22/06/13	carpocapse	madex	1	virus granulose	0
		vinaigre	0,5	vinaigre	0
01/07/13	carpocapse	madex	1	virus granulose	0
		vinaigre	0,5	vinaigre	0
02/06/13	tavelure	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		s de mg	4	mg	0
06/06/13	tavelure	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		solithe	4	calcium	0
09/06/13	tavelure	BN	12	soufre	2,76
11/06/13	tavelure	armicarb	4	bicarbonate de k	0
		soufre	3	soufre	2,55
13/06/13	carpocapse	carpovirusine	1	virus granulose	0
17/06/13	tavelure suie	cuivrol	0,7	cuivre	0,126
		soufre	2	soufre	1,7
		solithe	4	calcium	0
19/06/13	tavelure	armicarb	4	bicarbonate de k	0
		soufre	3	soufre	2,55
22/06/13	carpocapse	madex	1	virus granulose	0
		vinaigre	0,5	vinaigre	0
01/07/13	carpocapse	madex	1	virus granulose	0
		vinaigre	0,5	vinaigre	0
02/07/13	tavelure	cuivrol	0,7	cuivre	0,126
		s de mg	4	mg	0
16/07/13	pucerons	savon noir	5	savon noir	0
		alcool	2	alcool	0
16/07/13	tavelure	cuivrol	0,6	cuivre	0,108
31/07/13	tavelure	armicarb	3	bicarbonate de k	0
		soufre	3	soufre	2,55
10/08/13	carpocapse	BT	1	BT	0
17/08/13	tavelure	armicarb	3	bicarbonate de k	0
		soufre	3	soufre	2,55
19/08/13	conservation	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		sulfate de MG	4	mg	0
20/08/13	carpocapse	BT	1	BT	0
		vinaigre	0,5	vinaigre	0
06/09/13	conservation	cuivrol	0,75	cuivre	0,135
		oxychlorure	0,05	cuivre	0,0175

		s de mg	4	mg	0
19/09/13	conservation	cuivrol	1	cuivre	0,18
		cacl2	5	calcium	0
30/09/13	conservation	cuivrol	0,8	cuivre	0,144
		cacl2	4	calcium	0
05/10/13	conservation	solithe	4	calcium	0
		cuivrol	1	cuivre	0,17
		cacl2	4	calcium	0
11/10/13	mise en réserve	borozinc	4	engrais	0
	pucerons	argile	30	argile	0
21/10/13	conservation	cuivrol	0,9	cuivre	0,153
		solithe	4	soufre	0
					85,188

Tableau XLIX : liste des traitements phytosanitaires du verger conventionnel



MIN BP 417 - 82004 Montauban

Emis le 17-10-2013

CALENDRIER DES TRAITEMENTS PAR PARCELLE

COOPERATIVE : TROIS DOMAINES

ESPECE : POMME

EXPLOITANT : SCEA DES VERGERS DE GASCOGNE DRAPE Michel - 39064

Parcelle : 037 Variété : GOLDEN Lieu : BORDENEUVE
Surface : 0.8438 Désignation : GOLDEN SMOOTHIE 1987 Agrément : AC_GGP_TNC
Floraison : 14/04/2013 Récolte : 01/10/2013

DATE	Vol	FONGICIDE	INSECTICIDE	ACARICIDE	DIVERS	CIBLE	OBS / Chauffeur-Tracteur-Attelage	PRIX
ECLAIRCISSEMENT								
03/05/2013	500				MAXCEL 5.00	éclaircissage	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
					RHODOFIX 1.50	éclaircissage	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
DESHERBAGE								
25/04/2013	0				AMITRIL UNO 5.00	dicotylédones, g	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
					AMINUGEC 600 0.80	chardons, lisero	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
PHYTO								
15/03/2013	250	CUPROCAFFARO 5.00				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
22/03/2013	250	DITHANE M45 2.00				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
26/03/2013	250		OVI PHYT 2.00			puceron, cocheni	Un rang sur deux.; Traitement préfl	0
			MANDARIN PRO 0.25			pucerons	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
		DITHANE M45 2.00				tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
29/03/2013	250	DITHANE M45 2.00				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0

VI. Annexes

Parcelle : **037** Variété : **GOLDEN** Lieu : **BORDENEUVE**
 Surface : **0.8438** Désignation : **GOLDEN SMOOTHIE 1987** Agrément : **AC_GGP_TNC**
 Floraison : **14/04/2013** Récolte : **01/10/2013**

DATE	Vol	FONGICIDE	INSECTICIDE	ACARICIDE	DIVERS	CIBLE	OBS / Chauffeur-Tracteur-Attelage	PRIX
PHYTO (Suite)								
		CHORUS 0.45				tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
03/04/2013	250	SYLLIT 1.69				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
09/04/2013	250	thiovit jet 5.00	SUPREME 0.25			pucerons	Un rang sur deux.; Traitement préfl MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
		DITHANE M45 2.00				tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
12/04/2013	250		DIPEL DF 1kg 0.75			carpocapse	Un rang sur deux.; Début de vol MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
		DITHANE M45 2.00				tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
16/04/2013	250	THIOVIT jet mic 5.00			BM START 2.00	tavelure, oïdium	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
		DELAN WG 0.50				tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
18/04/2013	250				BM START 2.00	tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
		DELAN WG 0.50				tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
25/04/2013	0				LI 700 2.50	adjuvant	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
25/04/2013	250	THIOVIT jet mic 5.00	KLARTAN 0.20			tavelure, oïdium	Un rang sur deux.; Foyers de lanigér MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
		DELAN WG 0.50				pucerons	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
						tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
29/04/2013	250	DELAN WG 0.50				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
02/05/2013	250			AGRIMEC GOLD 0.75		acariens	Un rang sur deux.; Forte prognose hi MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0

VI. Annexes

Parcelle : **037** Variété : **GOLDEN** Lieu : **BORDENEUVE**
 Surface : **0.8438** Désignation : **GOLDEN SMOOTHIE 1987** Agrément : **AC_GGP_TNC**
 Floraison : **14/04/2013** Récolte : **01/10/2013**

DATE	Vol	FONGICIDE	INSECTICIDE	ACARICIDE	DIVERS	CIBLE	OBS / Chauffeur-Tracteur-Attelage	PRIX
PHYTO (Suite)								
		DELAN WG 0.50			HELIOSOL 2.00	adjuvant tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0
03/05/2013	500				LI 700 2.50	adjuvant	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
04/05/2013	250	DELAN WG 0.50 thiovit jet 6.25	TEPPEKI 0.14			pucerons tavelure	Un rang sur deux.; Foyers de lanigèr MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0 0
07/05/2013	250	thiovit jet 6.25 DELAN WG 0.50	TEPPEKI 0.14			pucerons tavelure	Un rang sur deux.; Foyers de lanigèr MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0 0
07/05/2013	250	DELAN WG 0.50 THIOVIT jet mic 5.00	TEPPEKI 0.14			pucerons tavelure tavelure, oidiu	Foyers de lanigères Un rang sur deux MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0 0
10/05/2013	250	DELAN WG 0.50				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
14/05/2013	250	DELAN WG 0.50				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
16/05/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
20/05/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90	CORAGEN 0.17			carpocapee, tord tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0
23/05/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0

VI. Annexes

Parcelle : **037** Variété : **GOLDEN** Lieu : **BORDENEUVE**
 Surface : **0.8438** Désignation : **GOLDEN SMOOTHIE 1987** Agrément : **AC_GGP_TNC**
 Floraison : **14/04/2013** Récolte : **01/10/2013**

DATE	Vol	FONGICIDE	INSECTICIDE	ACARICIDE	DIVERS	CIBLE	OBS. / Chauffeur-Tracteur-Attelage	PRIX
PHYTO (Suite)								
27/05/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
30/05/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90			HELIOGOL 2.00	tavelure adjuvant	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0
31/05/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90	PRECISION 0.30		HELIOGOL 2.00	carpocapse, mine tavelure adjuvant	Un rang sur deux.; Maintien de la pr MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0 0
06/06/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90 TOPSIN 70 WG 1.00	ACTARA 0.30			tavelure botrytis oeil pucerons lanigè	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0 0
11/06/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90	PYRINEX ME 2.00			carpocapse tavelure	Un rang sur deux.; Maintien de la pr MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0
17/06/2013	250	DRLAN WG 0.50				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
19/06/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
25/06/2013	250		CALYPSO 0.25			carpocapse, tord	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
10/07/2013	250		CALYPSO 0.25			carpocapse, tord	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
24/07/2013	250		PEARL PROTECH 0.50			carpocapse	Un rang sur deux.; Maintien de la pr MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
09/08/2013	250	RHODIASAN FLASH 2.50	AFFIRM 2.00			carpocapse, tord tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0 0

VI. Annexes

Parcelle : **037** Variété : **GOLDEN** Lieu : **BORDENEUVE**
 Surface : **0.8438** Désignation : **GOLDEN SMOOTHIE 1987** Agrément : **AC_GGP_TNC**
 Floraison : **14/04/2013** Récolte : **01/10/2013**

DATE	Vol	FONGICIDE	INSECTICIDE	ACARICIDE	DIVERS	CIBLE	OBS / Chauffeur-Tracteur-Attelage	PRIX
PHYTO (Suite)								
22/08/2013	250	MERPAN 80 WDG 1.90	AFFIRM 2.00			tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
						carpocapse, tord	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
02/09/2013	250	DELAN WG 0.50	PEARL PROTECH 0.50			carpocapse	Un rang sur deux.; Maintien de la pr MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
						tavelure	MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
10/09/2013	250	DELAN WG 0.50				tavelure	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
20/09/2013	250	BELLIS 0.80				conservation	Un rang sur deux. MERCANTON-LAMBORGHINI-A S D	0
COUT TOTAL								0

Localisation géographique du conservatoire végétal, du producteur biologique et du producteur conventionnel

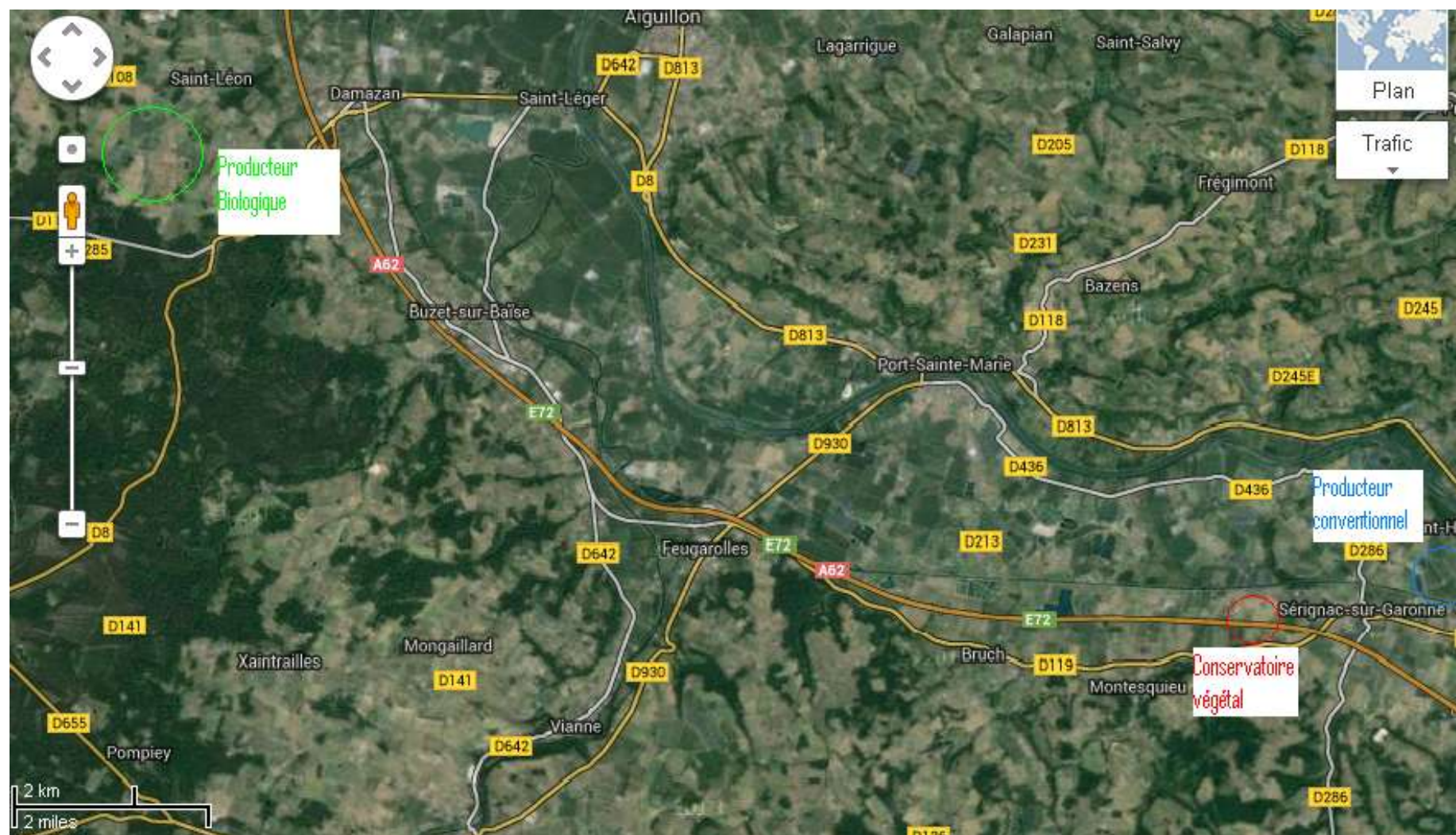


Figure 103 : vue d'ensemble des points de prélèvement de pommes

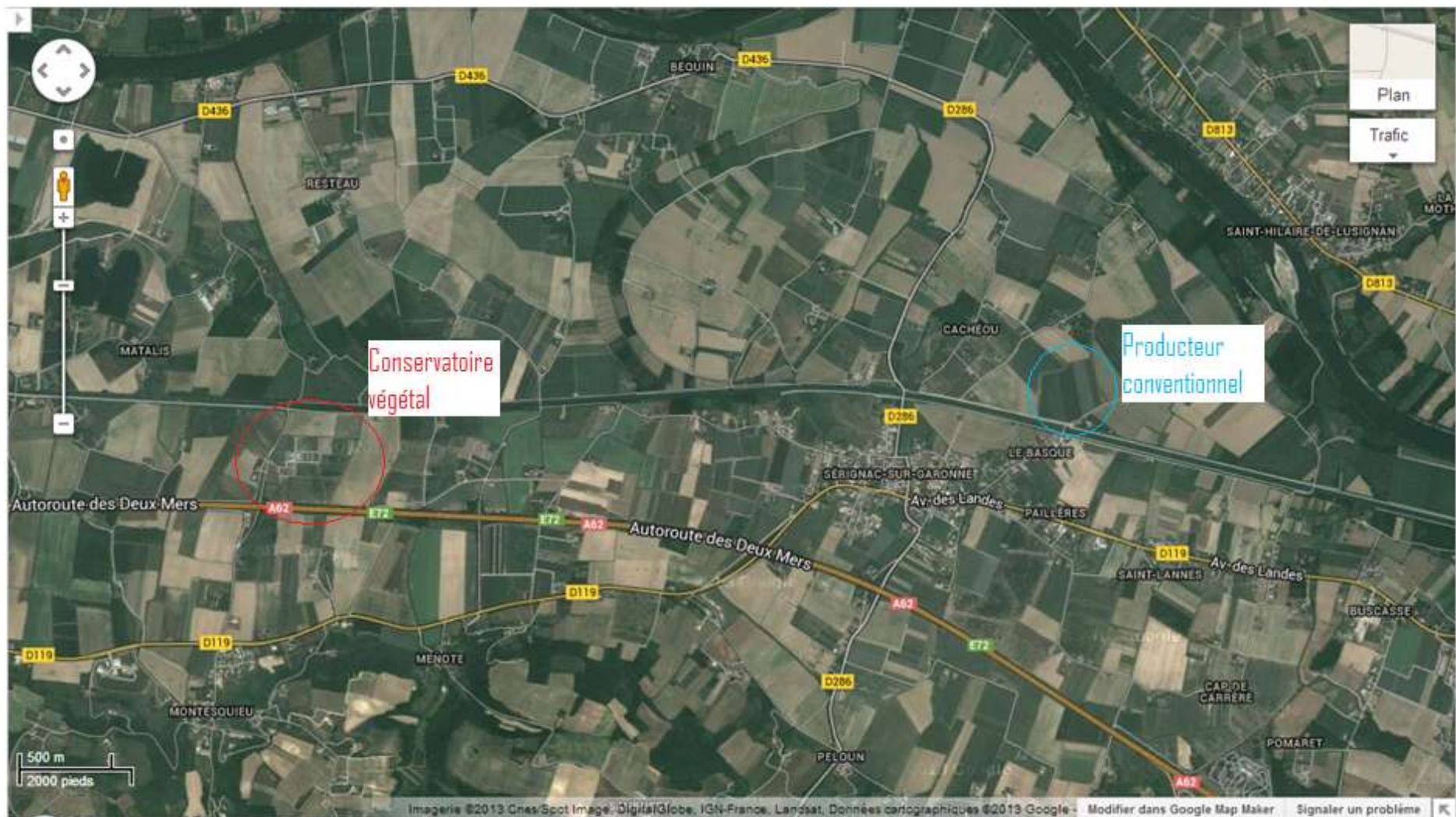


Figure 104 : vue d'ensemble des points de prélèvement de pommes

Conservatoire végétal :



Figure 105 : vue aérienne du site : emplacement approximatif (à quelques mètres près)

Conservatoire végétal :



Figure 106 : parcelle A (raisonnée) Lot 1 : 4 arbres (les lots 2 et 3 ont des fruits plus petits ou malade et moins nombreux)

Conservatoire végétal :



Figure 107 : parcelle E non traitée



Producteur conventionnel

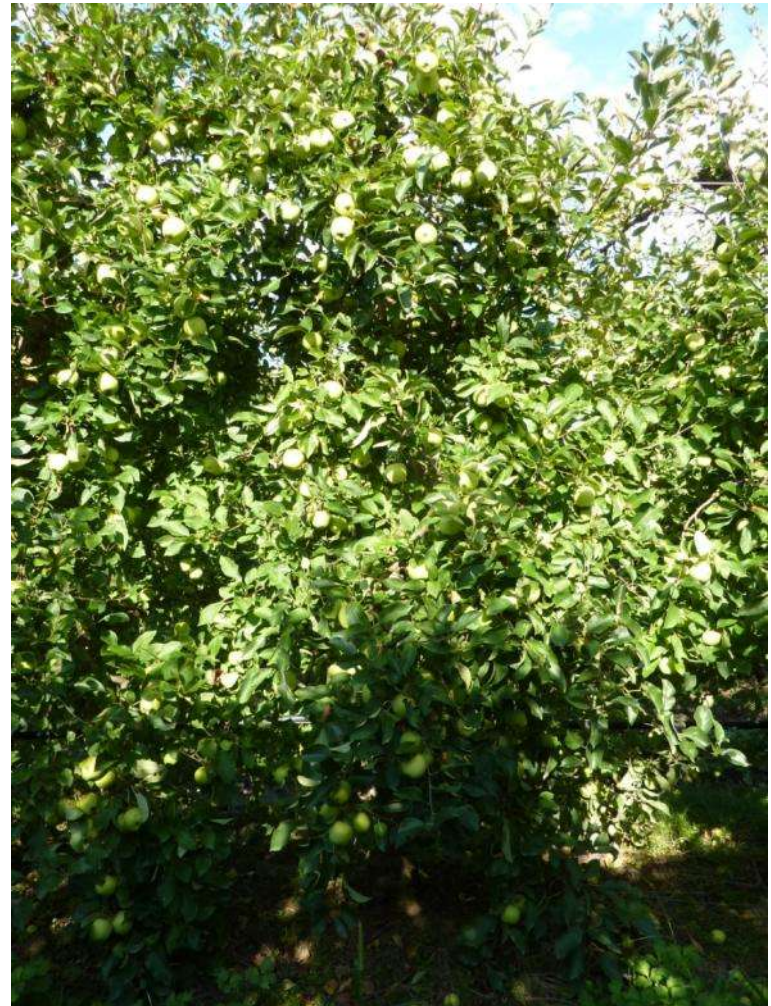


Figure 108 : vue Aérienne du verger conventionnel

Producteur conventionnel



Figure 109 : photos du verger en agriculture conventionnelle



Producteur biologique

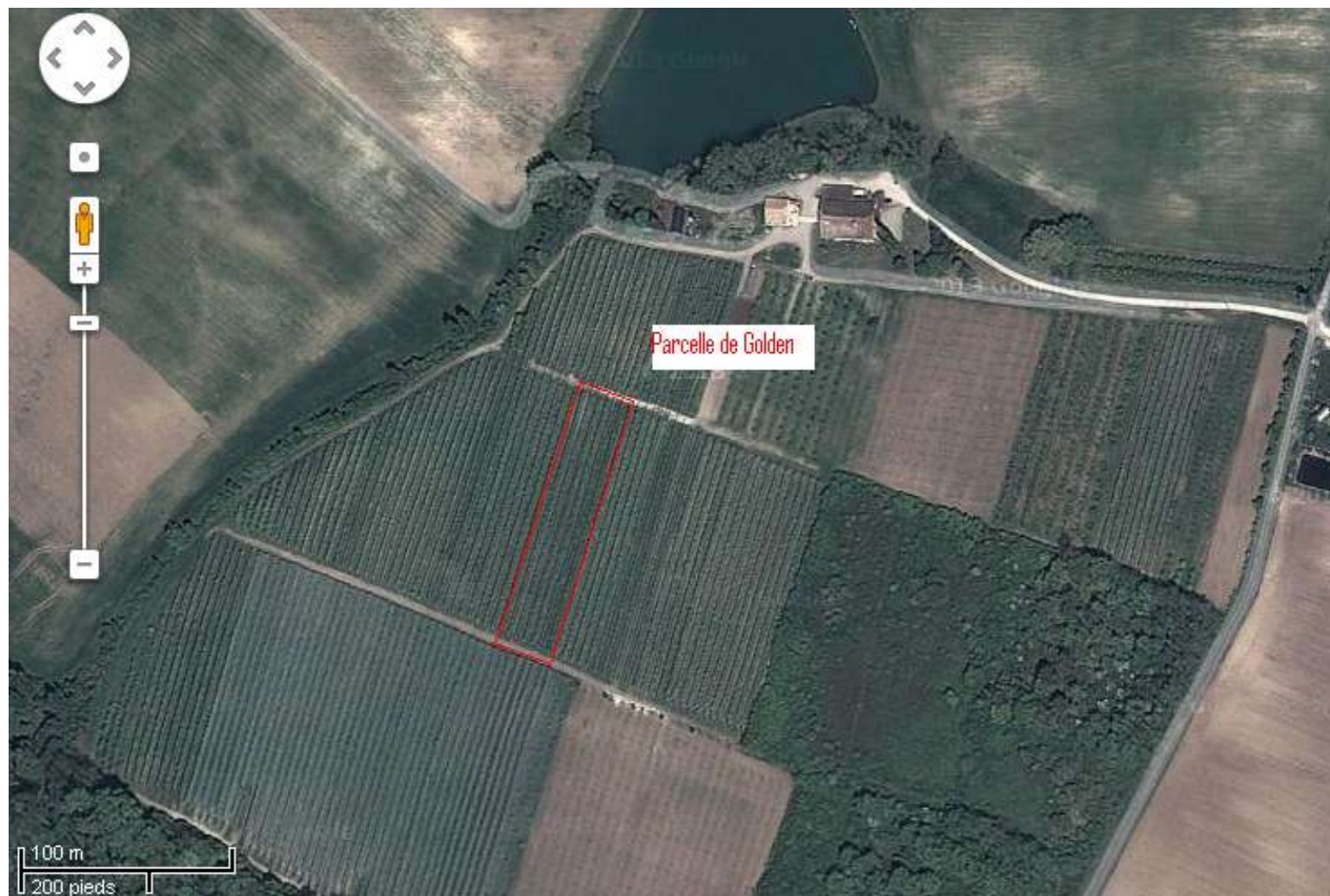


Figure 110 : vue aérienne du verger biologique

Producteur biologique



Figure 111 : photos du verger en agriculture biologique

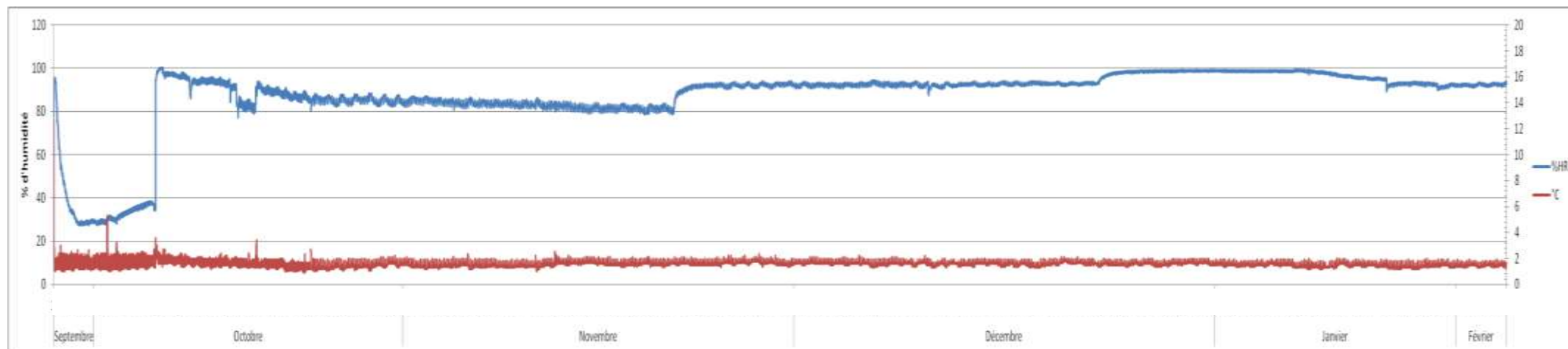


Figure 112 : suivi de température (en rouge) et d'hygrométrie (en bleu) du dans le caisson de stockage des pommes Bio

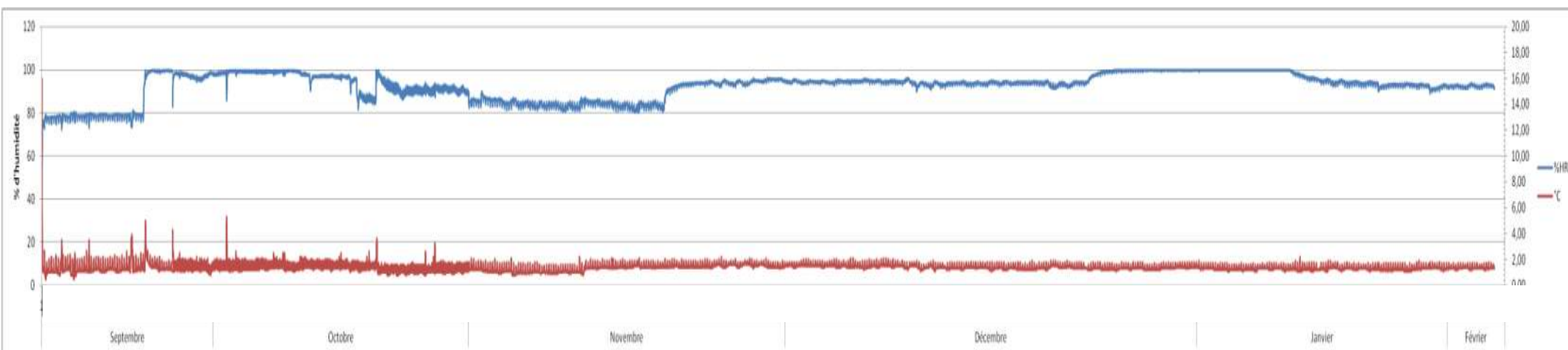


Figure 113 : suivi de température (en rouge) et d'hygrométrie (en bleu) du dans le caisson de stockage des pommes Conventionnelles

Annexe III

Figure 114 : notice de la carte Tempo® TVC

REF 80 007

12600H - fr - 2011/05 **FR**

TEMPO® TVC (Flore totale)

12600H - fr - 2011/05

TEMPO® TVC (Flore totale) *Pour contrôle microbiologique exclusivement*

TEMPO TVC (Flore totale) est un test automatisé sur TEMPO, permettant le dénombrement de la flore mésophile aérobique revivable en 40-48 heures dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement.

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

TEMPO TVC est à utiliser exclusivement avec le système TEMPO pour le dénombrement de la flore mésophile aérobique revivable en 40-48 heures dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement.

Ce test a été développé afin d'obtenir des performances analogues à la norme EN ISO 4833 (1), au protocole AOAC 966.23 et aux Standard Methods for the Examination of Dairy Products (SMEDP) approuvées par l'American Public Health Association (2).

Le dénombrement de cette flore constitue un indicateur de la qualité sanitaire du produit et pourra représenter l'état de fraîcheur ou l'état d'altération du produit. Sur le produit manipulé ou soumis à divers traitements technologiques, le dénombrement de la flore totale peut permettre de juger la qualité des opérations de production, transport et entreposage.

PRINCIPE

Le test TEMPO TVC est composé d'un flacon de milieu de culture et d'une carte, spécifiques au test.

Le milieu de culture estensemencé avec l'échantillon à tester. L'ensemble est transféré dans les 48 puits de trois volumes différents de la carte, grâce au TEMPO Filler. La carte est constituée de 3 séries de 16 puits (petits, moyens et grands) avec une différence de volume d'un log entre chaque série de puits. La carte a été conçue de façon à simuler la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) (3, 4). La carte est ensuite scellée hermétiquement afin de garantir sa manipulation ultérieure sans risque de contamination.

Au cours de l'incubation, les microorganismes présents dans la carte dégradent le substrat du milieu de culture et permettent l'apparition d'un signal fluorescent détecté par le TEMPO Reader. En fonction du nombre et du type des puits positifs, le système TEMPO déduit le nombre de microorganismes présents au départ dans l'échantillon selon un calcul basé sur la méthode NPP.

COMPOSITION DU COFFRET (48 TESTS) :

Cartes TEMPO TVC 2 x 24	Cartes munies d'un tube de transfert, prêtes à l'emploi et destinées à un usage unique.
Milieu de culture TEMPO TVC 2 x 24 flacons	Chaque flacon contient le milieu de culture, sous forme déshydratée. Chaque dose de milieu de culture est destinée à un usage unique. Dose pour 4 mL.
1 notice fournie dans le coffret ou téléchargeable sur www.biomérieux.com/techlib	

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE TEMPO TVC

Formule théorique en g/L de solution reconstituée.

Elément nutritif et suppléments de croissance.....	4,5
Système Tampon.....	25,7
Substrats.....	0,06
Antimousse.....	0,4

pH 7,4

Les références ci-dessous sont données à titre d'exemple :

Diluants primaires préconisés pour les échantillons alimentaires :

- Tryptone Sel (90 mL - Réf. bioMérieux 42 021)
- Eau peptonée tamponnée (90 mL - Réf. bioMérieux 42 042)
- Solution de citrate de sodium ou solution d'hydrogénophosphate dipotassique selon EN ISO 6887-5 : 2010 point 5.3 (5)
- Diluant tamponné au phosphate (Butterfield) (7)
- Ou tout autre diluant dont la compatibilité avec le système TEMPO aura préalablement été validée par le laboratoire utilisateur

Diluants primaires préconisés pour les tests d'environnement (écouvillons - lingettes) :

- Solution neutralisante Difco (Réf. 236210 Neutralizing Buffer for environmental samples)
- Lethen Broth, Modified (8)
- Ou tout autre diluant dont la compatibilité avec le système TEMPO aura préalablement été validée par le laboratoire utilisateur

Diluants secondaires préconisés :

- Eau distillée stérile ou eau purifiée équivalente validée par l'utilisateur

Matériel recommandé pour le contrôle de qualité :

- Densimat (Réf. bioMérieux 99 234)
- Gélose Trypase Soja [TSA] (Réf. bioMérieux 43 011)

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour contrôle microbiologique exclusivement.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (ex. norme EN ISO 7218 (10)).
- Le milieu de culture ne doit pas être utilisé comme matériau ou composant de fabrication.
- Les prélèvements et milieux ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer au Manuel de Sécurité Biologique en Laboratoire - OMS - Genève - dernière édition, ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs et consommables après la date de péremption indiquée sur leur étiquette.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser les milieux de culture dont l'aspect n'est pas homogène (présence d'agglomérats ou d'humidité).
- Ne pas utiliser de cartes visiblement altérées.
- Ne pas mettre directement en contact l'échantillon et le milieu de culture en poudre sans réhydratation préalable du milieu.
- Les cartes non scellées par le TEMPO Filler ne doivent pas être utilisées.
- La carte TEMPO n'est pas prévue pour faire du repiquage à partir des puits positifs.
- Ne pas écrire sur les puits de la carte ni sur les codes à barres.
- Ne pas coller d'étiquette sur la carte.
- Le TEMPO Reader, TEMPO Filler et les portoirs doivent être régulièrement nettoyés et décontaminés (se reporter aux Manuels d'Utilisation).
- Tout changement ou modification dans la procédure pourra avoir une incidence sur les résultats et devra être validé par le laboratoire. bioMérieux ne pourra en aucun cas être tenue responsable des résultats obtenus suite à des changements ou modifications dans des procédures non validées par bioMérieux. Dans un tel cas, bioMérieux n'assure aucune garantie.

CONDITIONS DE STOCKAGE

- Conserver le coffret TEMPO TVC à 2-25°C.
- Après ouverture du coffret, et après chaque utilisation, refermer soigneusement l'emballage des cartes (sachet ou blister).
- Ne pas laisser les cartes à la lumière (sur la pailasse ou le présentoir) plus de 15 jours.
- Éviter d'exposer les cartes directement à la lumière d'une lampe UV.
- Tous les composants sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur leur étiquette, lorsqu'ils sont conservés dans les conditions préconisées.

ECHANTILLONS ALIMENTAIRES

Nature des échantillons

Le système TEMPO est utilisable pour l'analyse d'une large variété de produits d'alimentation humaine et produits d'alimentation pour animaux de compagnie.

Préparation

Laisser revenir à température ambiante (18-25°C) les diluants primaires et secondaires (voir liste des diluants préconisés dans le paragraphe "Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis").

Suivre les recommandations des normes ISO en vigueur [ou BAM (6) si applicable] pour la réalisation des prélèvements et de la suspension mère. En particulier :

- pour les produits acides, s'assurer lors de la mise en solution que le pH soit ramené à la neutralité (EN ISO 6887-4 point 8.2) (9).
- pour les herbes aromatiques, épices, thés et infusions, aliments connus pour leur activité inhibitrice, une dilution minimale au 1/400 est nécessaire (EN ISO 6887-4 point 9.5.4.4) (9).

Pour la préparation des échantillons, réaliser une dilution au 1/10 de l'échantillon (**dilution primaire**), en utilisant l'un des diluants primaires préconisés. Par exemple, ajouter aseptiquement 10 g ou 10 ml de l'échantillon à 90 ml de Tryptone Sel. Homogénéiser dans le sac TEMPO (voir mode d'utilisation du sac TEMPO décrit dans le Manuel d'Utilisation - Poste de Préparation TEMPO).

Respecter un délai maximum de 45 minutes entre l'homogénéisation de la dilution primaire et le transfert dans la carte TEMPO, sauf indications particulières mentionnées dans la Norme internationale spécifique (9).

MODE OPERATOIRE

Pour des instructions complètes, se référer aux Manuels d'Utilisation du système TEMPO.

Protocole certifié NF validation selon la norme EN ISO 16140 (11) (N° BIO 12/15 - 09/05)

Réalisation du test pour les échantillons alimentaires

Exemple de la réalisation d'une dilution 1/400 permettant un dénombrement compris entre 100 et 4,9x10⁵ UFC/g. En fonction de la contamination attendue, la dilution peut être modifiée. Seuls les diluants ISO listés page 1 peuvent être utilisés dans le cadre de ce protocole.

1. Sortir un flacon de milieu de culture par échantillon à tester et laisser revenir à température ambiante avant utilisation.
2. Régler à 3,9 mL le dispenseur contenant le diluant secondaire et amorcer la pompe en éliminant les deux premiers volumes distribués.
3. Se connecter sur le poste de préparation TEMPO.
4. Selon les instructions de l'interface utilisateur du poste de préparation, identifier l'échantillon à tester, soit en le saisissant au clavier, soit en utilisant le lecteur de codes à barres du poste de préparation.
5. Reconstituer le milieu de culture en distribuant à l'aide du dispenseur 3,9 mL de diluant secondaire par flacon.
6. A l'aide d'une pipette stérile, prélever 0,1 mL dans le compartiment filtré du sac TEMPO et le transférer dans le flacon contenant le milieu de culture reconstitué. Homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex durant environ 3 secondes. Les 4 mL de milieu ensemencé obtenus correspondent à une dilution au 1/400 de l'échantillon.

7. Sortir une carte par flacon de milieu ensemencé, **sans toucher** la partie terminale du tube de transfert. Bien vérifier la concordance des codes (couleurs et abréviations) entre la carte et le milieu ensemencé.
8. Associer à l'identifiant de l'échantillon à tester les codes à barres du milieu ensemencé et de la carte correspondants en utilisant le lecteur de codes à barres du poste de préparation, selon les instructions de l'interface utilisateur du poste de préparation.
9. Déposer le flacon contenant le milieu ensemencé sur un portoir de remplissage. Déposer la carte en face du flacon, avec le tube de transfert de la carte plongé dans le flacon. Le portoir accueille jusqu'à 8 flacons + cartes et permet de remplir simultanément 1 à 8 cartes TEMPO.
10. Insérer le portoir dans le TEMPO Filler et lancer le cycle de remplissage. Le milieu ensemencé est aspiré en totalité dans la carte. Après remplissage des cartes, le TEMPO Filler coupe et soelle les tubes de transfert. L'ensemble de ces opérations est réalisé automatiquement et dure 3 minutes. Le cycle de remplissage est commun à tous les paramètres et permet le remplissage simultané de cartes associées à des paramètres différents.
11. Sortir le portoir de remplissage du TEMPO Filler et vérifier visuellement que les flacons sont vides. Retirer les cartes du portoir, et les transférer sur des portoirs d'incubation : insérer les cartes dans les positions prévues, en plaçant l'étiquette de la carte face à l'utilisateur (du côté de la poignée du portoir). Regrouper sur un même portoir des cartes à incuber à la même température. Chaque portoir accueille jusqu'à 20 cartes. N'insérer les cartes que dans les positions prévues.
12. Éliminer les flacons et les tubes de transfert utilisés dans un récipient approprié.
13. Incuber les cartes 40-48 heures à 30 ± 1°C, afin d'obtenir des performances analogues à la norme EN ISO 4833 (1).

Protocole pour obtenir des performances analogues à celles obtenues selon le protocole AOAC 966.23 et aux SMEDP (2)

L'étude AOAC a été réalisée sur 8 catégories de produits alimentaires :

- viande (porc haché cru, bœuf haché surgelé, rôti de bœuf cuit),
- volaille (dinde fumée, poulet haché frais, nuggets de poulet surgelés, poulet grillé),
- poisson et fruits de mer (cabillaud cru, loup de mer cru surgelé, poisson surgelé précuit, crabe cuisiné),
- fruits et légumes (germes de soja crus, haricots verts surgelés, salade prête à l'emploi),
- produits laitiers (lait pasteurisé, glace vanille)
- divers (omelette surgelée, pommes de terre sautées).

Les résultats ont été obtenus avec le diluant au phosphate de Butterfield comme diluant primaire et différentes dilutions du 1/40 au 1/4000 (permettant un dénombrement compris entre 10 et 49 millions d'UFC/g).

Réaliser les opérations TEMPO précédentes décrites dans les alinéas 1 à 12 puis incuber les cartes 40-48 heures à 36 ± 1°C (AOAC) ou 32 ± 1°C pour les produits laitiers (SMEDP).

Note : La durée d'incubation du test est gérée par le logiciel TEMPO Read qui intègre un laps de temps théorique de 15 minutes entre la lecture du code barres de la carte et le début de l'incubation. Si ce laps de temps réel est supérieur à 15 minutes, (sans jamais excéder 2 heures), il convient de tenir compte de ce délai supplémentaire par rapport au temps d'incubation restant affiché par le logiciel TEMPO Read. Dans tous les cas la lecture devra impérativement être réalisée dans l'intervalle 40-48 heures autorisé par le logiciel.

Lecture des cartes en fin d'incubation

1. Se connecter au poste de lecture.
2. Introduire le portoir d'incubation contenant les cartes à lire dans le lecteur. Le lecteur assure pour chaque carte la lecture des codes à barres et l'interprétation des résultats de fluorescence des puits. Il associe automatiquement l'identifiant de l'échantillon avec le type de test, la dilution et les résultats de dénombrement. La lecture des cartes TEMPO TVC peut être différée après la fin de l'incubation en les stockant à 2-8°C pour un maximum de 48 heures. Dans ce cas, laisser les cartes revenir à température ambiante (environ 5-15 minutes) avant de les introduire dans le lecteur. Il est important de souligner que le résultat obtenu est annoté de la mention "La carte a été lue trop tard". L'utilisateur peut préciser dans la cellule commentaire que les cartes ont été lues après avoir été réfrigérées.
3. Edition des résultats : sur l'écran du poste de lecture le nombre d'UFC (unités formant colonies) par gramme ou millilitre de produit initial est associé à l'identifiant de l'échantillon, au paramètre testé et à la date d'analyse.
4. L'interface utilisateur du poste de lecture permet d'imprimer les résultats ou de les transmettre à l'informatique du laboratoire. Elle permet également la consultation de l'historique des résultats obtenus les jours précédents.
5. A la fin de l'analyse, retirer les cartes du portoir et les éliminer dans un récipient approprié.

ECHANTILLONS D'ENVIRONNEMENT (hors certification NF VALIDATION)

Nature des échantillons

Le protocole proposé s'applique à l'écouvillonnage des équipements, des surfaces ou des mains, avec des écouvillons pré humidifiés ou à l'essuyage des surfaces avec des lingettes ou éponges. Compte tenu de la diversité des échantillons d'environnement, nous vous recommandons de valider préalablement ce protocole ou tout autre protocole d'environnement.

Préparation

Aussitôt après écouvillonnage ou essuyage de la surface, transférer directement l'écouvillon ou la lingette utilisé dans un volume de l'un des diluants primaires préconisés. Ceci constitue la dilution primaire de l'échantillon.

Exemple de réalisation du test pour les écouvillons d'environnement

Transférer l'écouvillon dans 10 mL, ce qui correspond à une dilution au 1/10 de l'échantillon (**dilution primaire**). Homogénéiser soigneusement la suspension en agitant l'écouvillon dans le diluant et en pressant l'écouvillon contre la paroi du tube de diluant. Une dilution minimum au 1/40 permettant un dénombrement compris entre 10 et 4,9x10⁴ UFC/surface écouvillonnée est recommandée. En fonction de la contamination attendue, la dilution peut être augmentée.

1. Sortir un flacon de milieu de culture par échantillon à tester et laisser revenir à température ambiante avant utilisation.
2. Régler à 3 mL le dispenseur contenant le diluant secondaire et amorcer la pompe en éliminant les deux premiers volumes distribués.
3. Se connecter sur le poste de préparation TEMPO.
4. Selon les instructions de l'interface utilisateur du poste de préparation, identifier l'échantillon à tester, soit en le saisissant au clavier, soit en utilisant le lecteur de codes à barres du poste de préparation.
5. Reconstituer le milieu de culture en distribuant à l'aide du dispenseur 3 mL de diluant secondaire par flacon.
6. A l'aide d'une pipette stérile, prélever 1 mL dans le tube contenant la suspension obtenue par écouvillonnage et le transférer dans le flacon contenant le milieu de culture reconstitué. Homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex durant environ 3 secondes. Les 4 mL de milieu ensemencé obtenus correspondent à une dilution au 1/40 de l'échantillon d'environnement recueilli sur la surface écouvillonnée.
7. Modifier la dilution par défaut sur le logiciel TEMPO en saisissant "40" afin d'obtenir une dilution au 1/40.
8. Réaliser les opérations TEMPO décrites à partir de l'alinéa 7 du paragraphe "Réalisation du test pour les échantillons alimentaires".

RESULTATS ET INTERPRETATION

Dès la lecture terminée, les résultats sont analysés automatiquement par le système informatique qui détermine le résultat de positivité de chacun des puits. Le nombre de puits positifs obtenus, rapporté au volume des puits et à la dilution de l'échantillon permet d'obtenir, selon les tables de la méthode NPP (Nombre le Plus Probable), le résultat de dénombrement de l'échantillon de départ en UFC par gramme ou millilitre.

CONTROLE DE QUALITE

Les réactifs TEMPO font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique de la bonne mise en œuvre de la méthode TEMPO est réalisable par l'utilisateur avec les souches suivantes :
Escherichia coli ATCC® 25922
Bacillus subtilis ATCC 8633

Protocole recommandé :

- Les différentes étapes d'incubation seront effectuées aux températures de 30 ± 1°C ou de 35 ± 1°C.
- A partir d'une culture de 24 heures sur Gélose Trypcase Soja, préparer une suspension en Tryptone Sel et ajuster à 0,5 McFarland soit environ 10⁸ UFC/mL pour *E. coli* et 10⁷ UFC/mL pour *B. subtilis* à l'aide du Densimat (voir "Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis"). Effectuer des dilutions décimales successives en Tryptone Sel jusqu'à l'obtention d'une suspension d'environ 10³ UFC/mL théorique. Pour chaque souche, transférer 0,1 mL de cette suspension dans un flacon de milieu de culture préalablement réhydraté avec 3,9 mL d'eau distillée stérile.
- Modifier la dilution par défaut sur le logiciel TEMPO en saisissant "40" afin d'obtenir une dilution au 1/40.
- Remplir une carte par flacon de milieu et incuber.
- Parallèlement, vérifier le niveau de population de la suspension ayant servi à ensemencer la carte TEMPO par étalement sur TSA de 0,1 mL de la suspension à 10³ UFC/mL. Incuber.
- Après incubation, effectuer la lecture de la carte.
- En fin d'incubation des boîtes, dénombrer les colonies sur TSA.

Résultats attendus :

Pour les 2 souches, calculer le ratio R :

$$R = \frac{\text{Résultat TEMPO (UFC/g)}}{10 \times \text{nombre de colonies sur TSA}}$$

R doit être compris entre 0,1 et 10.

Dans le cas où les résultats de dénombrement s'écartent des valeurs attendues, veuillez contacter bioMérieux SA ou son représentant local.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en œuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Des résultats invalides peuvent apparaître lorsque le remplissage de la carte est mal réalisé (présence de puits vides et/ou présence de liquide résiduel dans le flacon après remplissage) : par exemple en cas d'utilisation d'un sac filtrant autre que celui préconisé (voir paragraphe "Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis").
 - Une mauvaise préparation ou conservation des échantillons peut entraîner des résultats incorrects.
 - Attention :** Le paramètre TEMPO TVC a été évalué sur de nombreuses matrices alimentaires, à l'exclusion des boissons gazeuses. Cependant compte tenu de la diversité des matrices testées n'altère pas la fiabilité des résultats. En particulier, le signal fluorescent peut être altéré si la dilution primaire est fortement colorée (par exemple, purées de fruits et cacao) : pour le test TEMPO TVC une dilution de ces matrices au moins égale à 1/400 est recommandée.
 - L'usage de TEMPO TVC n'est pas recommandé pour l'analyse microbiologique des produits à forte activité enzymatique. Cette restriction concerne en particulier les abats rouges crus, les mollusques crus, et les noix, noisettes, amandes et certaines farines.
- L'usage de TEMPO TVC doit être vérifié préalablement pour les produits riches en farines ou en féculs : pâte crue, préparations prêtes à l'emploi pour gâteaux, et soupes et sauces déshydratées.
- De même, l'usage de TEMPO TVC doit être vérifié préalablement pour certains produits fumés/salés.
- Par ailleurs, le réactif TEMPO TVC permet le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale comme décrit dans les protocoles normalisés. Les conditions d'incubation peuvent ne pas être optimales pour la croissance de certaines bactéries lactiques. Il est conseillé aux laboratoires testant des produits fermentés de réaliser une vérification interne.

Voir les Manuels d'Utilisation TEMPO pour des informations plus complètes.

Le paramètre TEMPO TVC est validé selon la norme EN ISO 16140 (11) en tant que méthode alternative d'analyse pour tous les produits d'alimentation humaine et alimentation pour animaux de compagnie, à l'exception des boissons et des produits d'alimentation du bétail. La méthode TEMPO TVC a été certifiée NF VALIDATION par rapport à la méthode de référence décrite dans la norme EN ISO 4833 (1).

L'attestation BIO 12/15 - 09/05 est valide jusqu'au 19/09/2013 et peut être obtenue auprès de notre service Assistance Technique.



Le paramètre TEMPO TVC a été validé et certifié par l'AOAC Official Methods (N° 2008.10) pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale. La méthode TEMPO TVC a été comparée au protocole AOAC 966.23 et à la méthode SMEDP (Standard Methods for the Examination of Dairy Products) pour les produits non laitiers, et les produits laitiers, respectivement.

Le test TEMPO TVC, pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans les produits alimentaires, a été validé par l'AOAC Research Institute en décembre 2006 (Attestation N° 120602).



120602 - 12/27/06
PERFORMANCE TESTED METHOD
Certifié par AOAC Research Institute
www.aoc.org

ELIMINATION DES DECHETS

Les réactifs non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.

Éliminer les réactifs utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Norme EN ISO 4833 (2003) - Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes - Technique de comptage des colonies à 30°C.
- American Public Health Association (2004) 17^e Edition. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, APHA Washington DC.
- Cochran W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". (1950) Biometrics 6, 105-116.
- Woodward R.L. How probable is the most probable number ? (1957) J. Am. Water Works Assoc., 49, 1060, 1068.
- Norme EN ISO 6887-5 (2010) - Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. Partie 5 : Règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers.
- Bacteriological Analytical Manual (1998) 8^e Edition, Revision A, Chapter 3 "Aerobic Plate Count".
- Bacteriological Analytical Manual Online BAM Reagent R11 (January 2001).
- Bacteriological Analytical Manual Online BAM Media M79 (January 2001).
- Norme EN ISO 6887-4 - Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. Partie 4 : Règles spécifiques pour la préparation de produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche.
- Norme EN ISO 7218 - Microbiologie des aliments - Règles générales pour les examens microbiologiques.
- Norme EN ISO 16140 (2003) - Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

TABLE DES SYMBOLES

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusque
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests

BIOMERIEUX, le logo bleu et TEMPO sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales. ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection. Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.



bioMérieux SA
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy-l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomérieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15969,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11

Figure 115 : notice de la carte Tempo® YM

REF 80 001 12594E - fr - 2010/12 **FR**

TEMPO® YM (Levures/Moisissures) *Pour contrôle microbiologique exclusif*

TEMPO YM (Levures/Moisissures) est un test automatisé sur TEMPO, permettant le dénombrement des levures et moisissures en 72-76 heures dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement.

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

TEMPO YM est à utiliser exclusivement avec le système TEMPO pour le dénombrement des levures et des moisissures en 72-76 heures dans les produits alimentaires et les échantillons d'environnement. Ce test a été développé afin d'obtenir des performances analogues à la norme EN ISO 21527 (1) et au chapitre 18 du Bacteriological Analytical Manual (BAM) (2). Les moisissures constituent des agents de contamination et de dégradation de certains produits alimentaires. Certaines moisissures élaborent des mycotoxines qui diffusent dans l'aliment et peuvent, si elles sont en quantité suffisante, provoquer des intoxications aiguës ou chroniques. Les levures peuvent produire des altérations de la qualité marchande des produits alimentaires par formation de troubles, d'odeurs ou de goûts annexes anormaux (éthanol, variation de pH...), ou par gonflement des produits ou (et) de leurs emballages (CO₂)...

PRINCIPE

Le test TEMPO YM est composé d'un flacon de milieu de culture et d'une carte, spécifiques au test. Le milieu de culture est ensemencé avec l'échantillon à tester. L'ensemble est transféré dans les 48 puits de trois volumes différents de la carte, grâce au TEMPO Filler. La carte est constituée de 3 séries de 16 puits (petits, moyens et grands) avec une différence de volume d'un log entre chaque série de puits. La carte a été conçue de façon à simuler la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) (3, 4). La carte est ensuite scellée hermétiquement. Au cours de l'incubation, les levures et moisissures présentes dans la carte dégradent le substrat du milieu de culture et permettent l'apparition d'un signal fluorescent détecté par le TEMPO Reader. En fonction du nombre et du type des puits positifs, le système TEMPO déduit le nombre de levures et moisissures présentes au départ dans l'échantillon selon un calcul basé sur la méthode NPP.

COMPOSITION DU COFFRET (48 TESTS) :

Cartes TEMPO YM 2 x 24	Cartes munies d'un tube de transfert, prêtes à l'emploi et destinées à un usage unique.
Milieu de culture TEMPO YM 2 x 24 flacons	Chaque flacon contient le milieu de culture, sous forme déshydratée. Chaque dose de milieu de culture est destinée à un usage unique. Dose pour 4 ml.

1 notice fournie dans le coffret ou téléchargeable sur www.biomérieux.com/techlib

COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE TEMPO YM

Formule théorique en g/l de solution reconstituée.

Glucose	30
Éléments nutritifs (ovine et porcine)	10
Système Tampon et inhibiteurs *	4,9
Substrat	0,075
Antimousse	0,4
pH 5,0	

* Milieu T : TOXIQUE (Chloramphénicol ≥ 0,1 % dans le milieu déshydraté)

- R45 : Peut provoquer le cancer.
- R42/43 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation et par contact avec la peau.
- S22 : Ne pas respirer les poussières.
- S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage.
- S46 : En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

Pour plus d'informations, consulter la fiche de données de sécurité disponible sur demande.

MATÉRIEL ET REACTIFS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Matériel :

- Sacs TEMPO - Sacs à filtre latéral (Réf. bioMérieux 80 015)
- Stomacher (Modèle 400 ou équivalent)
- Pipettes permettant la distribution précise de 0,10 ml ou 1,0 ml d'échantillon
- Agitateur de type vortex
- Incubateur de laboratoire sous métrologie

Les références ci-dessous sont données à titre d'exemple :

Diluants primaires préconisés pour les échantillons alimentaires :

- Eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) (1)
- Tryptone Sel (90 ml - Réf. bioMérieux 42 021)
- Eau peptonée tamponnée (90 ml Réf. bioMérieux 42 042)

Produits laitiers uniquement : Solution de citrate de sodium ou solution d'hydrogénophosphate dipotassique selon ISO 8261 : 2001 point 5.3 (5)

Diluant tamponné au phosphate (Butterfield) (2)

- Ou tout autre diluant dont la compatibilité avec le système TEMPO aura préalablement été validée par le laboratoire utilisateur

Diluants primaires préconisés pour les tests d'environnement (écouvillons - lingettes) :

- Solution neutralisante Difco (Réf. 236210 Neutralizing Buffer for environmental samples)
- Lethen Broth, Modified (6)
- Ou tout autre diluant dont la compatibilité avec le système TEMPO aura préalablement été validée par le laboratoire utilisateur

Diluants secondaires préconisés :

- Eau distillée stérile ou eau purifiée équivalente validée par l'utilisateur

TEMPO® YM (Levures/Moisissures)

12594E - fr - 2010/12

Matériel recommandé pour le contrôle de qualité :

- Densimat (Réf. bioMérieux 99 234)
- Gélose Sabouraud Glucosée (SDA) (Réf. bioMérieux 43 555)
- Gélose Tryptose Soja [TSA] (Réf. bioMérieux 43 011)
- BioBall® MultiShot 550 contenant 550 UFC d'*Aspergillus niger* (Réf. bioMérieux 50 011)

PRECAUTIONS D'UTILISATION

Pour contrôle microbiologique exclusif.

Pour usage professionnel uniquement.

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (ex. norme ISO 7218 (8)).
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).
- Le milieu de culture sous sa forme déshydratée, contient un agent toxique (Chloramphénicol ≥ 0,1 %). Prendre connaissance des phrases de risques "R" et des conseils de prudence "S" cités sous la composition du milieu de culture.

- Le milieu de culture ne doit pas être utilisé comme matériau ou composant de fabrication.
- Les prélèvements et milieux ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe microbien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer au Manuel de Sécurité Biologique en Laboratoire - OMS - Genève - dernière édition, ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs et consommables après la date de péremption indiquée sur leur étiquette.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.

- Ne pas utiliser les milieux de culture dont l'aspect n'est pas homogène (présence d'agglomérats ou d'humidité).
- Ne pas utiliser de cartes visiblement altérées.
- Ne pas mettre directement en contact l'échantillon et le milieu de culture en poudre sans réhydratation préalable du milieu.**

- Les cartes non scellées par le TEMPO Filler ne doivent pas être utilisées.
- La carte TEMPO n'est pas prévue pour faire du repiquage à partir des puits positifs.
- Ne pas écrire sur les puits de la carte ni sur les odes à barres.
- Ne pas coller d'étiquette sur la carte.
- Le TEMPO Reader, TEMPO Filler et les portoirs doivent être régulièrement nettoyés et désinfectés (se reporter aux Manuels d'Utilisation).
- Tout changement ou modification dans la procédure pourra avoir une incidence sur les résultats et devra être validé par le laboratoire. bioMérieux ne pourra en aucun cas être tenu responsable des résultats obtenus suite à des changements ou modifications dans des procédures non validées par bioMérieux. Dans un tel cas, bioMérieux n'assume aucune garantie.

CONDITIONS DE STOCKAGE

- Conserver le coffret TEMPO YM non ouvert à 2-8°C.
- Après ouverture du coffret :
 - Refermer soigneusement l'emballage des cartes (sachet ou blister) après chaque utilisation.
 - Les réactifs peuvent être conservés à une température supérieure à 8°C jusqu'à 25°C pendant 1 mois maximum. Noter la nouvelle date de péremption (date de mise à température ambiante + 1 mois) dans le cadre prévu à cet effet sur l'étiquette étui des flacons (1, 2). Cette date ne peut en aucun cas dépasser la date de péremption initiale indiquée sur l'étiquette.
- Ne pas laisser les cartes à la lumière (sur la paillassse ou le présentoir) plus de 15 jours.
- Éviter d'exposer les cartes directement à la lumière d'une lampe UV.
- Tous les composants sont stables lorsqu'ils sont conservés dans les conditions préconisées.

ECHANTILLONS ALIMENTAIRES

Nature des échantillons

Le système TEMPO est utilisable pour l'analyse d'une large variété de produits d'alimentation humaine et produits d'alimentation pour animaux de compagnie.

Préparation

Laisser revenir à température ambiante (18-25°C) les diluants primaires et secondaires (voir liste des diluants préconisés dans le paragraphe "Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis").

Suivre les recommandations des normes ISO en vigueur (ou BAM (2) si applicable) pour la réalisation des prélèvements et de la suspension mère. En particulier :

- pour les produits acides, s'assurer lors de la mise en solution que le pH soit ramené à la neutralité (EN ISO 6887-4 point 8.2) (7).
- pour les herbes aromatiques, épices, thés et infusions, aliments connus pour leur activité inhibitrice, une dilution minimale au 1/400 est nécessaire (EN ISO 6887-4 point 9.5.4.4) (7).

Pour la préparation des échantillons, réaliser une dilution au 1/10 de l'échantillon (**dilution primaire**), en utilisant l'un des diluants primaires préconisés. Par exemple, ajouter aseptiquement 10 g ou 10 ml de l'échantillon à 90 ml de Tryptone Sel. Homogénéiser dans le sac TEMPO (voir mode d'utilisation du sac TEMPO décrit dans le Manuel d'Utilisation - Poste de Préparation TEMPO).

Respecter un délai maximum de 45 minutes entre l'homogénéisation de la dilution primaire et le transfert dans la carte TEMPO, sauf indications particulières mentionnées dans la Norme internationale spécifique (8).

MODE OPERATOIRE

Pour des instructions complètes, se référer aux Manuels d'Utilisation du système TEMPO.

Protocole validé par l'AOAC Research Institute (Attestation N° 041001)

Réalisation du test pour les échantillons alimentaires

Exemple de la réalisation d'une dilution 1/40 permettant un dénombrement compris entre 10 et 4,9x10⁴ UFC/g. En fonction de la contamination attendue, la dilution peut être modifiée.

Pour les diluants primaires et les dilutions recommandées, se référer au paragraphe "Limites du test".

- Sortir un flacon de milieu de culture par échantillon à tester et laisser revenir à température ambiante avant utilisation.
- Régler à 3 ml le dispensateur contenant le diluant secondaire et amorcer la pompe en éliminant les deux premiers volumes distribués.
- Se connecter sur le poste de préparation TEMPO.
- Selon les instructions de l'interface utilisateur du poste de préparation, identifier l'échantillon à tester, soit en le saisissant au clavier, soit en utilisant le lecteur de codes à barres du poste de préparation.
- Reconstituer le milieu de culture en distribuant à l'aide du dispensateur 3 ml de diluant secondaire par flacon.
- A l'aide d'une pipette stérile, prélever 1 ml dans le compartiment filtré du sac TEMPO et le transférer dans le flacon contenant le milieu de culture reconstitué. Homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex durant environ 3 secondes. Les 4 ml de milieu ensemencé obtenus correspondent à une dilution au 1/40 de l'échantillon.
- Sortir une carte par flacon de milieu ensemencé, sans toucher la partie terminale du tube de transfert. Bien vérifier la concordance des codes (couleurs et abréviations) entre la carte et le milieu ensemencé.
- Associer à l'identifiant de l'échantillon à tester les codes à barres du milieu ensemencé et de la carte correspondants en utilisant le lecteur de codes à barres du poste de préparation, selon les instructions de l'interface utilisateur du poste de préparation.
- Déposer le flacon contenant le milieu ensemencé sur un portoir de remplissage. Déposer la carte en face du flacon, avec le tube de transfert de la carte plongé dans le flacon. Le portoir accueille jusqu'à 6 flacons + cartes et permet de remplir simultanément 1 à 6 cartes TEMPO.
- Insérer le portoir dans le TEMPO Filler et lancer le cycle de remplissage. Le milieu ensemencé est aspiré en totalité dans la carte. Après remplissage des cartes, le TEMPO Filler coupe et soelle les tubes de transfert. L'ensemble de ces opérations est réalisé automatiquement et dure 3 minutes. Le cycle de remplissage est commun à tous les paramètres et permet le remplissage simultané de cartes associées à des paramètres différents.

- Sortir le portoir de remplissage du TEMPO Filler et vérifier visuellement que les flacons sont vides. Retirer les cartes du portoir, et les transférer sur des portoirs d'incubation : insérer les cartes dans les positions prévues, en plaçant l'étiquette de la carte face à l'utilisateur (du côté de la poignée du portoir). Regrouper sur un même portoir des cartes à incuber à la même température. Chaque portoir accueille jusqu'à 20 cartes. N'insérer les cartes que dans les positions prévues.
- Éliminer les flacons et les tubes de transfert utilisés dans un récipient approprié.
- Incuber les cartes 72-76 heures à 25 ± 1°C afin d'obtenir des performances analogues à la norme EN ISO 21527 (1) et au chapitre 18 du BAM (2).

La méthode TEMPO a été comparée au Chapitre 18 du BAM (2). L'étude AOAC a été réalisée sur les catégories suivantes de produits alimentaires :

- fruits (jus d'orange, jus de pomme, fraises surgelées),
- produits laitiers (fromage cheddar, yaourt glacé, lait en poudre pour nourrissons),
- divers (tortillas de blé, semoule de maïs, amandes, noix de pécan).

Note 1 : La durée d'incubation du test est gérée par le logiciel TEMPO Read qui intègre un laps de temps théorique de 15 minutes entre la lecture du code barres de la carte et le début de l'incubation. Si ce laps de temps réel est supérieur à 15 minutes, (sans jamais excéder 2 heures), il convient de tenir compte de ce délai supplémentaire par rapport au temps d'incubation restant affiché par le logiciel TEMPO Read. Dans tous les cas la lecture devra impérativement être réalisée dans l'intervalle 72-76 heures autorisé par le logiciel.

Note 2 : La tolérance de ± 1°C sur la température d'incubation doit être scrupuleusement respectée.

Lecture des cartes en fin d'incubation

- Se connecter au poste de lecture.
- Introduire le portoir d'incubation contenant les cartes à lire dans le lecteur. Le lecteur assure pour chaque carte la lecture des codes à barres et l'interprétation des résultats de fluorescence des puits. Il associe automatiquement l'identifiant de l'échantillon avec le type de test, la dilution et les résultats de dénombrement.
- Edition des résultats : sur l'écran du poste de lecture le nombre d'UFC (unités formant colonies) par gramme ou millilitre de produit initial est associé à l'identifiant de l'échantillon, au paramètre testé et à la date d'analyse.
- L'interface utilisateur du poste de lecture permet d'imprimer les résultats ou de les transmettre à l'informatique du laboratoire. Elle permet également la consultation de l'historique des résultats obtenus les jours précédents.
- A la fin de l'analyse, retirer les cartes du portoir et les éliminer dans un récipient approprié.

Note 1 : Manipuler les cartes TEMPO avec les mêmes précautions que des boîtes incubées, en raison du risque de diffusion/dissémination des moisissures.

Note 2 : Retirer le portoir du lecteur aussitôt après lecture et ne pas conserver les cartes au-delà de 76 heures.

Note 3 : Décontaminer les portoirs d'incubation après chaque utilisation en utilisant un produit fongicide ou selon le protocole de décontamination décrit dans le chapitre "Nettoyage et décontamination" (paragraphe "Portoir de remplissage et portoir d'incubation et de lecture") du Manuel d'utilisation du poste de préparation.

ECHANTILLONS D'ENVIRONNEMENT

Nature des échantillons

Le protocole proposé s'applique à l'écouvillonnage des équipements, des surfaces ou des mains, avec des écouvillons pré humidifiés ou à l'essuyage des surfaces avec des lingettes ou éponges. Compte tenu de la diversité des échantillons d'environnement, nous vous recommandons de valider préalablement ce protocole ou tout autre protocole d'environnement.

Préparation

Aussitôt après écouvillonnage ou essuyage de la surface, transférer directement l'écouvillon ou la lingette utilisé dans un volume de l'un des diluants primaires préconisés. Ceci constitue la dilution primaire de l'échantillon.

Exemple de réalisation du test pour les écouvillons d'environnement

Transférer l'écouvillon dans 10 ml, ce qui correspond à une dilution au 1/10 de l'échantillon (**dilution primaire**). Homogénéiser soigneusement la suspension en agitant l'écouvillon dans le diluant et en pressant l'écouvillon contre la paroi du tube de diluant. Une dilution minimum au 1/40 permettant un dénombrement compris entre 10 et 4,9x10⁴ UFC/surface écouvillonnée est recommandée. En fonction de la contamination attendue, la dilution peut être augmentée.

- Sortir un flacon de milieu de culture par échantillon à tester et laisser revenir à température ambiante avant utilisation.
- Régler à 3 ml le dispensateur contenant le diluant secondaire et amorcer la pompe en éliminant les deux premiers volumes distribués.
- Se connecter sur le poste de préparation TEMPO.
- Selon les instructions de l'interface utilisateur du poste de préparation, identifier l'échantillon à tester, soit en le saisissant au clavier, soit en utilisant le lecteur de codes à barres du poste de préparation.
- Reconstituer le milieu de culture en distribuant à l'aide du dispensateur 3 ml de diluant secondaire par flacon.
- A l'aide d'une pipette stérile, prélever 1 ml dans le tube contenant la suspension obtenue par écouvillonnage et le transférer dans le flacon contenant le milieu de culture reconstitué. Homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex durant environ 3 secondes. Les 4 ml de milieu ensemencé obtenus correspondent à une dilution au 1/40 de l'échantillon d'environnement recueilli sur la surface écouvillonnée.
- Réaliser les opérations TEMPO décrites à partir de l'alinéa 7 du paragraphe "Réalisation du test pour les échantillons alimentaires".

RESULTATS ET INTERPRETATION

Dès la lecture terminée, les résultats sont analysés automatiquement par le système informatique qui détermine le résultat de positivité de chacun des puits. Le nombre de puits positifs obtenus, rapporté au volume des puits et à la dilution de l'échantillon permet d'obtenir, selon les tables de la méthode NPP (Nombre le Plus Probable), le résultat de dénombrement de l'échantillon de départ en UFC par gramme ou millilitre.

CONTROLE DE QUALITE

Les réactifs TEMPO font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique de la bonne mise en œuvre de la méthode TEMPO est réalisable par l'utilisateur avec les souches suivantes :

Saccharomyces cerevisiae ATCC® 9783
Aspergillus niger ATCC 16404
Escherichia coli ATCC 8739

Protocole recommandé :

- A partir d'une culture de
 - 48 à 72 heures sur Sabouraud glucosé à 25°C pour *Aspergillus niger* et *Saccharomyces cerevisiae*
 - 24 à 72 heures sur Gélose Trypase Soja à 30°C pour *Escherichia coli*,
 préparer une suspension en Tryptone Sel et, à l'aide du Densimat (voir "Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis"), ajuster à :
 - 0,3 McFarland soit environ 10⁶ UFC/ml pour *S. cerevisiae*,
 - 1 McFarland soit environ 10⁵ UFC/ml pour *A. niger* (pour cette souche, la correspondance entre la densité optique et la concentration de la suspension peut varier fortement suivant l'état de développement de la souche (voir Note ci-dessous)),
 - 0,4 McFarland soit environ 10⁸ UFC/ml pour *E. coli*.
 - Effectuer des dilutions décimales successives en Tryptone Sel jusqu'à l'obtention d'une suspension d'environ :
 - 10² UFC/ml théorique pour *A. niger* et *S. cerevisiae*
 - 10³ UFC/ml théorique pour *E. coli*.
- Une alternative à la culture d'*Aspergillus niger* consiste à utiliser la souche sous forme de BioBall® (Réf. bioMérieux 56 011) contenant 550 UFC d'*Aspergillus niger*. Dissoudre la BioBall dans 5,5 ml de Tryptone Sel par agitation au vortex jusqu'à complète dispersion de la bille (10 à 20 secondes minimum). On obtient directement une suspension à 10² UFC/ml théorique.**
- Pour les levures et moisissures, transférer 1 ml de la suspension d'environ 10² UFC/ml théorique dans un flacon de milieu de culture préalablement réhydraté avec 3 ml de diluant secondaire. Procéder de même avec *E. coli*, mais transférer 1 ml de suspension à 10³ UFC/ml.

- Modifier la dilution par défaut sur le logiciel TEMPO en saisissant "4" afin d'obtenir une dilution au 1/4.
- Remplir une carte par flacon de milieu et incubé.
- Parallèlement, vérifier le niveau de population de la suspension ayant servi à ensemencer la carte TEMPO par étalement :
 - sur SDA de 0,1 ml de la suspension à 10^3 UFC/ml pour *S. cerevisiae*
 - sur deux boîtes de SDA de 0,5 ml de la suspension à 10^2 UFC/ml pour *A. niger*
 - sur TSA de 0,1 ml de la suspension à 10^3 UFC/ml pour *E. coli*.
- Incuber comme indiqué ci-dessus.
- Après incubation, effectuer la lecture des cartes. Dénombrer les colonies sur SDA. Dans le cas d'*A. niger*, additionner les dénombrements des deux boîtes. Vérifier la présence d'*E. coli* sur TSA.

Note : Pour *Aspergillus niger* obtenu sur SDA, afin d'assurer une concentration effective d'environ 10^2 UFC/ml, il est conseillé d'ensemencer 3 cartes TEMPO à partir des dilutions successives 10^4 , 10^3 et 10^2 UFC/ml théoriques. Parallèlement, vérifier le niveau de population de chacune des suspensions par étalement sur deux boîtes de SDA de 0,5 ml de chaque suspension utilisée pour ensemencer les cartes. Interpréter les résultats de la carte ensemencée avec la suspension la plus proche de l'inoculum 10^2 UFC/ml attendu.

Résultats attendus :

Souches de levures et moisissures

Calculer le ratio R :

$$R = \frac{\text{Résultat TEMPO (UFC/g)}}{10 \times \text{nbre de colonies sur SDA}}$$

R doit être compris entre 0,01 et 1.

Escherichia coli doit être totalement inhibé par TEMPO YM (le logiciel TEMPO indique alors : dénombrement < 1 UFC/g).

Dans le cas où les résultats de dénombrement s'écartent des valeurs attendues, veuillez contacter bioMérieux SA ou son représentant local.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en œuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Des résultats invalides peuvent apparaître lorsque le remplissage de la carte est mal réalisé (présence de puits vides et/ou présence de liquide résiduel dans le flacon après remplissage) : par exemple en cas d'utilisation d'un sac filtrant autre que celui préconisé (voir paragraphe "Matériel et réactifs nécessaires mais non fournis").
- Une mauvaise préparation ou conservation des échantillons peut entraîner des résultats incorrects.
- **Attention :** Le paramètre TEMPO YM a été évalué sur de nombreuses matrices alimentaires, à l'exclusion des boissons gazeuses. Cependant compte tenu de la diversité des matrices alimentaires et des procédés de fabrication, nous vous recommandons de vérifier que la composition des matrices testées n'altère pas la fiabilité des résultats. En particulier, le signal fluorescent peut être altéré si la dilution primaire est fortement colorée (par exemple, purées de fruits et cacao) : pour le test TEMPO YM une dilution de ces matrices au moins égale à 1/400 est recommandée.
- L'usage du TEMPO YM n'est pas recommandé pour le dénombrement des levures et moisissures dans les yaourts.
- Pour les produits fortement contaminés en flore totale (produits fermentés, produits à DLC), une dilution minimale au 1/400 est recommandée.
- Pour les diluants primaires solution de citrate de sodium et solution d'hydrogénophosphate dipotassique, en raison de leur influence sur le pH du milieu TEMPO YM, une dilution inférieure au 1/400 n'est pas autorisée.
- Pour le diluant primaire eau peptonée tamponnée, une dilution minimale au 1/400 est recommandée.

Voir les *Manuels d'Utilisation TEMPO* pour des informations plus complètes.

Le test TEMPO YM, pour le dénombrement des levures et moisissures dans les produits alimentaires, a été validé par l'AOAC Research Institute en avril 2010 (Attestation N° 041001).



ELIMINATION DES DECHETS

Éliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Norme EN ISO 21527 (2008) – Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures.
 - ISO 21527-1 Partie 1 : Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95.
 - ISO 21527-2 Partie 2 : Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0,95.
2. Bacteriological Analytical Manual Online BAM Chapter 18 "Yeasts, molds and mycotoxins" (January 2001).
3. Cochran W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". (1950) Biometrics 6, 105-116.
4. Woodward R.L. How probable is the most probable number ? (1957) J. Am. Water Works Assoc., 49, 1060, 1068.
5. Norme EN ISO 8261 (2001) – Lait et produits laitiers – Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.
6. Bacteriological Analytical Manual Online BAM Media M79 (January 2001).
7. Norme EN ISO 6887-4 – Microbiologie des aliments – Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. Partie 4: Règles spécifiques pour la préparation de produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche.
8. Norme EN ISO 7218 - Microbiologie des aliments – Règles générales pour les examens microbiologiques.

TABLE DES SYMBOLES

Symbole	Signification
	Référence du catalogue
	Fabricant
	Limites de température
	Utiliser jusqu'à
	Code du lot
	Consulter les instructions d'utilisation
	Contenu suffisant pour "n" tests

BIOMÉRIEUX, le logo bleu, BioBall et TEMPO sont des marques utilisées, déposées et/ou enregistrées appartenant à bioMérieux SA ou à l'une de ses filiales.

ATCC est une marque appartenant à American Type Culture Collection.

Les autres marques et noms de produits mentionnés dans ce document sont des marques commerciales de leurs détenteurs respectifs.

Annexe IV

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments	Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results							
					Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>					Metschnikowia sp. XY103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	1134	1134	96%	0.0	99%	DQ367881.1
<input type="checkbox"/>					Metschnikowia sp. XY201 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra	1090	1090	96%	0.0	99%	DQ367882.1
<input type="checkbox"/>					Metschnikowia aff. pulcherrima P01A016 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal R	1083	1083	100%	0.0	97%	JX188181.1
<input type="checkbox"/>					Unidentified Metschnikowia ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (17)21	1074	1074	93%	0.0	99%	AM161102.1
<input type="checkbox"/>					Metschnikowia pulcherrima strain NRRL Y-7111 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos	1072	1072	100%	0.0	97%	JX188179.1
<input type="checkbox"/>					Metschnikowia aff. chrysoperlae NRRL Y-6259 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboso	1072	1072	100%	0.0	97%	JX188178.1
<input type="checkbox"/>					Metschnikowia aff. chrysoperlae NRRL Y-6259 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S riboso	1072	1072	100%	0.0	97%	JX188177.1
<input type="checkbox"/>					Metschnikowia aff. chrysoperlae P34A005 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal f	1072	1072	100%	0.0	97%	JX188172.1
<input type="checkbox"/>					Unidentified Metschnikowia ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (55)3	1068	1068	93%	0.0	99%	AM161115.1
<input type="checkbox"/>					Unidentified Metschnikowia ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (54)18	1068	1068	93%	0.0	99%	AM161105.1
<input type="checkbox"/>					Unidentified Metschnikowia ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (14)14	1068	1068	93%	0.0	99%	AM161104.1
<input type="checkbox"/>					Unidentified Metschnikowia ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (43)1	1068	1068	93%	0.0	99%	AM161103.1
<input type="checkbox"/>					Unidentified Metschnikowia ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone (24)7	1062	1062	93%	0.0	99%	AM161107.1

Figure 116 : exemple de résultat de comparaison de résultat de séquençage avec les bases de données

- Une seule bande est visualisée sur gel. Après analyse dans les banques de données, il s'agirait d'un fragment PCR de 245 pb présent dans le locus LOC103420821 de la pomme golden (*Malus domestica*).

```
>gi|658042925|ref|XR_527149.1| PREDICTED: Malus x domestica uncharacterized
LOC103420821 (LOC103420821), misc_RNA
ATGTGCAAGTGCCGTTACATGGAACCTTTCCCTCTTCGGCCTTCAAAGTTCTCATTTGAATATTTGCTACTAC
CACCAAGATCTGCACCGACGGCCGCTCCGCCCCGGGCTCGCGCCCCAGGTTTTGCGGCGACCGCCGCGCCCTCCTA
CTCATCGGGGCTGGCGCTTGCCCCGACGGCCGGGTGTAGGTCGCGCGCTTCAGCGCCATCCATTTTCGGGGCTA
GTTGATTCCGGCAGGATCGCCCGTTGACTCGCACACATGTCAGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCCGAAT
GGGGAGCTCGCAGGCCGACGYCGGGAGCGCGCAGTTGCCGAAGCACGCCGGTGCGGCGCGCGCTGCCCCGCCACGA
TCGCGTCGACGGCGTCTCCTCGGGCGTATCGACAGCCCCGGGCTTTGGCCGCCGCCGAATCCGCGTCGGTCCACG
CCCCGAGCCGATCGGCGGACCGGCCTGTGACCGTTCCGCATCCGACCGGGGCGCATCGCCAGCCCCCATCCGCTT
CCCTCCCGACAATTTCAAGCACTCTTTGACTCTCTTTTCAAAGTCTTTTTCATCTTTCCCTCGCGGTACTTGTGTT
GCTATCGGTCTCTCGCCCGTATTTAGCCTTGGACAGAATTTACCGCCCGATTGGGGCTGCATTCCCAAACAACCC
GACTCGCCGACAGCGCCTCGTGGTGCGACAGGGTCCGGGCACAACGGGGCTCTCACCTCTCCGGCGCCACCTTC
CAGTGGACTTGGGCCCCGTCCGCCGTGAGGACGCTTCTCCAGACTACAATTCGAACGCCGACGGCGCCCGATTTC
TCAAGCTGGGCTGTTCCCGGTTTCGCTCGCCGTTACTAGGGGAATCCTCGTAAGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAATTCAGCGGGTAACCCCGCCTTRACCTGGGGTTCGCGTTGAAAGCTCCGCCGAAGCGAGAGCAGCGAG
CGTCGCGGGCCGCTCGGAGCGCGACGAAAGCGCACAACCTGGCAACCGAGGTTTCGACGACCACCGATTGTCGTGGC
GTTTCGTCGCGGAGGACCCGGCATTTGTGCGYACCGCGCGGGGTGACGCACGGGAGGCCATCGTCCGCCCCCGAC
GCTCCCGAGGGATGCGCGGGGGGGCAACGGCGTGTGACGCCAGGACGGCGTGCCCTCGGCCTGATGGCTTCGGG
CGCAACTTGCGTTCAAAGACTCGATGGTTTACGRGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGTACGTTT
TTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTTTTGACTTATCGAAGACGACGACGACCCGCGC
GCGCACCGATTCCGGGGCGGCGGGAGCGCGCTCTTCGTTTCAGATTCTTGGCGCAACACGCGCCGGTGTAAGTT
TGTACGCCCCGGGACGGGCTCCCGGGACGAAGGGGACGCCGGGCCAGGAGGCCCGCGACCCCGAAGTTGAAAC
GGGTCTCGGGTCGTTCTGCGGTGCAGGTTTCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTACG
ACTTCTCCTTCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTGCGGGCAGCGAACCCCGCGTCGCC
GCGATCCGAACACTTCACCGGACCATTCAATCGGTAGGAGCGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGGACGTAGT
CAACGCGAGCTGATGACTCGCGCTTACTAGGAATTCCTCGTTGAAGACCAACAATTGCAATGATCTATCCCCATC
ACGATGAAATTTCAAAGATTACCCGGGCCTGTGCGCCAAGGCTATAGACTCGTTGAATACATCAGTGTAGCGCGC
GTGCGGCCCCAGAATCTAAGGGCATCACAGACCTGTTATTGCCTCAAACCTTCTTGGCCTAAGCGGCCATAGTC
CCTCTAAGAAGCTGGCCGCGGAGGATGACCTCCGCATAGCTAGTTAGCAGGCTGAGGTCTCGTTTCGTTAACGGAA
TTAACCAGACAAATCGCTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACCACCACCCATAGAATCAAGAAAGAGCTCTCAG
TCTGTCAATCCTTACTATGTCTGGACCTGGTAAGTTTCCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGCCGAGGCTCCACTCC
TGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTCCTTTAAGTTTTCAGCCTTGCGACCATACTCCCCCGGAACCCAAAAAATTTGA
TTTCTCATAAGGTGCCGGCGAGTCTAAAAGTAACATCCGCCGATCCCTGGTTCGGCATCGTTTATGGTTGAGAC
TAGGACGGTATCTGATCGTCTTCGAGCCCCCACTTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGGMAATGCTTT
CGCAGTTGTTTCGTCTTTCATAAATCCAAGAATTTACCTCTGACTATGAAATACGAATGCCCCCGACTGTCCCTG
TTAATCATTACTCCGATCCCGAAGGCCAACAGAATAGGACCGAAA
```

```
>XR_527149.1 PREDICTED: Malus x domestica uncharacterized LOC103420821
(LOC103420821), misc_RNA
```

```
Product length = 245
```

```
Forward primer 1 GCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 25
```

```
Template 904 AG..... 882
```

```
Reverse primer 1 ATTCCCAAACAACCTCGACTC 20
```

```
Template 661 .....C..... 680
```

Figure 117 : séquence du locus LOC103420821 de *Malus domestica* à laquelle s'hybride les amorces NL1-LS2

Annexe V

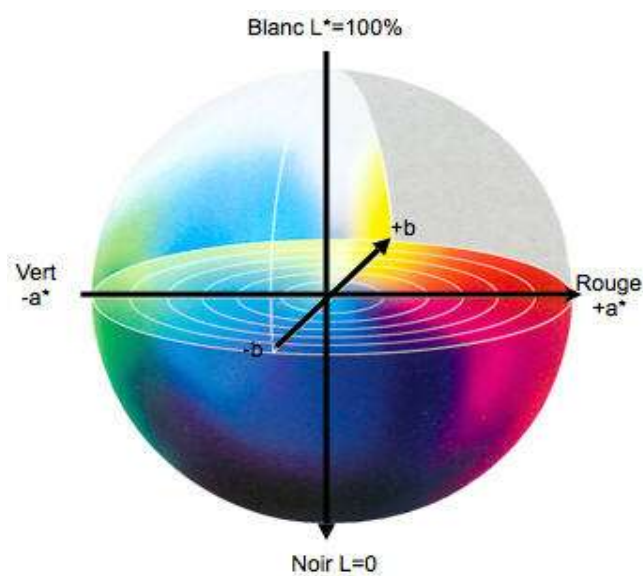


Figure 118 : système colorimétrique CIELab

Tableau L : délais de mise en régime du dispositif de traitement à la vapeur à différentes températures de consigne

Consigne (°C)	Délai de mise en régime (min)
45	16
50	16
55	16,5
60	17
65	18
70	19
75	19
80	25,5
85	23

Annexe VI

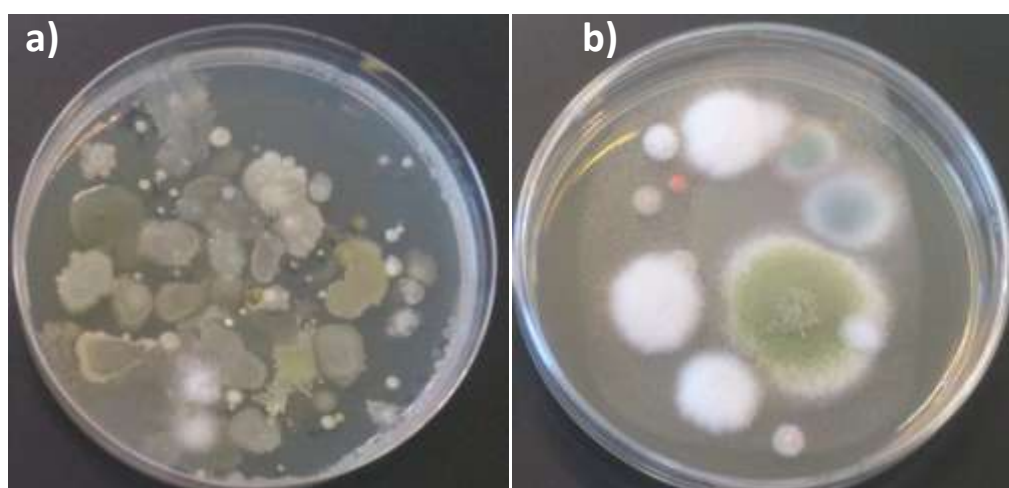


Figure 119 : boîtes de dénombrement de Poudre 1, dilution 1/100 a) FAM (PCA) ; b) levures / moisissures (Sabouraud au chloramphénicol)



Figure 120 : à gauche, Poudre 3 non traitée, à droite, Poudre 3 traitée par autoclave



Figure 121 : à gauche, Poudre 2 non traitée, à droite, Poudre 2 traitée par autoclave